



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA
Faculdade de Medicina Veterinária

DESINFECÇÃO DE ALFACES POR AÇÃO DO CLORO E DO VINAGRE E
DESENVOLVIMENTO DE UM SISTEMA DE SEGURANÇA PARA ALFACE EM
ESTABELECIMENTOS DE RESTAURAÇÃO COLETIVA

Francisca Fernandes Figueiredo

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Presidente:

Doutor Fernando Manuel d'Almeida Bernardo

Vogais:

Doutora Yolanda Maria Vaz

Doutora Marília Catarina Leal Fazeres Ferreira

Mestre André de Sousa Trêpa Magalhães

ORIENTADOR

Mestre André de Sousa Trêpa
Magalhães

CO-ORIENTADOR

Doutora Marília Catarina Leal Fazeres
Ferreira

2013

LISBOA

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. André Magalhães, pela sua disponibilidade profissional e pessoal, pela motivação, orientação e transmissão de conhecimentos que tornaram possível a elaboração desta dissertação.

Às Professoras Doutora Marília Ferreira e Yolanda Vaz, cuja simpatia e disponibilidade foram essenciais para que este trabalho fosse concluído.

Ao Laboratório de Segurança Alimentar da FMV/UTL, em especial à Helena e à Maria José, pela atenção, paciência e total disponibilidade para transmissão de conhecimentos.

A todos os que, na minha vida pessoal e profissional, me apoiaram com total flexibilidade de horários, carinho, amor e amizade incondicionais.

RESUMO

“Lavagem E Desinfecção De Alfaces Por Ação Do Cloro E Do Vinagre E Relação Com O Sistema HACCP Em Estabelecimentos De Restauração Coletiva”

O tema desta dissertação centra-se na abordagem a criação de um sistema de segurança para alfaces (*Lactuca sativa*) destinadas a serem consumidas cruas em restauração coletiva, foi efetuada a caracterização microbiológica de alface e a eficiência relativa de diversos tipos de desinfetantes. Com este propósito foram analisadas amostras submetidas a lavagem com água destilada, desinfetadas com cloro e desinfetadas com uma solução combinada de cloro e vinagre. Os parâmetros microbiológicos escolhidos como indicadores gerais de higiene foram aeróbios totais a 30°C e contagem de *E. coli*. Para a contagem de *E. coli* todos os resultados foram satisfatórios (95%) ou aceitáveis (5%) de acordo com os valores guia do INSA para alface sujeita a lavagem, desinfecção com cloro e desinfecção com cloro e vinagre. Nas contagens de aeróbio totais a 30°C as desinfecções com cloro causaram uma redução de 1 log em 63,6% das contagens, uma redução de 2 log em 9,1% e uma redução superior a 2 log em 27,3% destas. As desinfecções com solução combinada de cloro-vinagre resultaram numa redução de 2 log em 38,5% das contagens de aeróbios totais e numa redução superior a 2 log em 61,5% das mesmas.

Palavras-chave: alface, cloro, desinfecção, HACCP, segurança dos alimentos, vegetais crus, vinagre.

ABSTRACT

“Lettuce Wash And Disinfection By Chlorine And Vinegar Action And Its Relationship With The HACCP System For Mass Catering Establishments”

This experimental work was based on three topics, the creation of a food safety system for lettuce (*Lactuca sativa*) to be eaten raw in mass catering, the microbiological characterization of lettuce and a review about different types of disinfectants and their relative efficacy. For this purpose, the analysis performed included total aerobic plate counts and *E. coli* counts as indicators of general hygiene. The samples included washed lettuce and disinfected lettuce with both chlorine and vinegar combined with chlorine. For the *E. coli* counts all the results were both satisfactory (95%) and acceptable (5%) according the INSA standard values. The disinfection of lettuce with chlorine solution resulted on a microbial reduction of 1 log in 63.6% of the counts, 2 log in 9.1% and a reduction greater than 2 log in 27.3%, for total aerobic counts. Lettuce disinfection with the combined solution of vinegar and chlorine resulted on a microbial reduction of 2 log in 38.5% of the total aerobic plate counts and on a reduction greater than 2 log in 61.5% of the total aerobic counts.

Keys-words: chlorine, disinfection, food safety, HACCP, lettuce, raw vegetables, vinegar.

ÍNDICE GERAL

AGRADECIMENTOS.....	i
RESUMO.....	ii
ABSTRACT.....	iii
ÍNDICE GERAL.....	iv
ÍNDICE DE TABELAS.....	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
ÍNDICE DE GRAFICOS	vii
LISTA DE ABREVIATURAS	viii
1. INTRODUÇÃO	1
2. PRODUÇÃO E PREPARAÇÃO PARA CONSUMO DE ALFACES	3
2.1 Práticas produtivas e fontes de microrganismos patogénicos	3
2.2 Toxinfecções alimentares devido ao consumo de vegetais crus	4
2.3 Microbiota e critérios microbiológicos	5
2.4 Medidas de controlo: pré-colheita, colheita e pós-colheita.....	10
2.4.1 Pré-colheita.....	11
2.4.2 Durante a colheita.....	14
2.4.3 Após a colheita.....	15
2.5 Lavagem e desinfeção.....	17
2.5.1 Fatores que afetam a eficácia da lavagem e da desinfeção.....	17
2.5.2 Desinfetantes químicos.....	24
2.5.2.1 Cloro como desinfetante.....	24
2.5.2.2 Dióxido de cloro	27
2.5.2.3 Peróxido de hidrogénio	28
2.5.2.4 Ozono	28
2.5.2.5 Ácidos orgânicos.....	30
2.5.2.6 Extratos de plantas	31
2.5.3 Desinfetantes físicos.....	32
2.5.3.1 Água electrolisada	33
2.5.3.2 Irradiação	34
2.5.3.3 Radiação UV.....	35
3 DESENVOLVIMENTO DE UM SISTEMA DE SEGURANÇA PARA AS ALFACES NAS CANTINAS DA UTL	37
3.1 Requisitos gerais	37
3.2 Pré-requisitos do sistema de segurança dos alimentos	38
3.3 Etapas preliminares à análise de perigos.....	39
3.3.1 Equipa de segurança alimentar	39
3.3.2 Descrição do produto alimentar	40

3.3.3 Utilização esperada	41
3.3.4 Descrição do processo	42
3.4 Análise de perigos	43
3.4.1 Perigos físicos	45
3.4.2 Perigos químicos	45
3.4.3 Perigos Biológicos	48
3.5 Seleção e avaliação das medidas de controlo: estabelecimento de um programa de pré-requisitos operacionais.....	52
3.6 Verificação e validação.....	56
4. EFICÁCIA DO CLORO E DO CLORO ASSOCIADO AO VINAGRE NA DESINFECÇÃO DE	
ALFACES	57
4.1 Objetivos.....	
4.2 Material e métodos.....	
4.2.1 Análises microbiológicas.....	58
4.2.1.1 Contagem de microrganismos aeróbios totais a 30°C	58
4.2.1.2 Contagem de <i>Escherichia coli</i>	59
4.2.2 Análises físico-químicas.....	59
4.2.2.1 Determinação de pH.....	59
4.2.3 Análise de dados.....	59
4.3 Resultados.....	61
4.3.1 Resultados das análises microbiológicas.....	61
4.3.1.1 Resultados das contagens de microrganismos aeróbios totais a 30°C	61
4.3.1.2 Resultados das contagens de <i>Escherichia coli</i>	62
4.3.2 Resultados das análises físico-químicas.....	63
5. DISCUSSÃO	65
6. CONCLUSÃO	73
7. BIBLIOGRAFIA.....	74
ANEXO I Contagens de microrganismos aeróbios totais a 30°C (ufc/g)	83
ANEXO II Contagens de <i>Escherichia coli</i> (ufc/g)	85

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Comparação da prevalência de <i>E. coli</i> de acordo com o tempo de maturação dos fertilizantes utilizados.....	5
Tabela 2 – Comparação da presença de <i>Escherichia coli</i> em amostras de produção convencional, produção convencional, produção biológica certificada e não certificada.....	6
Tabela 3 – Boas práticas a aplicar antes da colheita para garantir a qualidade microbiológica dos vegetais.....	7
Tabela 4 – Boas práticas na colheita.....	8
Tabela 5 – Boas práticas pós colheita.....	9
Tabela 6 – Valores guia para avaliação da qualidade microbiológica de alimentos cozinhados prontos a comer.....	13
Tabela 7 – Resultados das contagens de aeróbios totais nas amostras analisadas.....	14
Tabela 8 – Resultados das contagens de bolores e leveduras nas amostras analisadas.....	14
Tabela 9 – Resultados da incidência de agentes patogénicos nas amostras analisadas.....	14
Tabela 10 – Exemplos de agentes patogénicos associados a doenças veiculadas pelo consumo de vegetais crus.....	17
Tabela 11 – Contagem de aeróbios totais e coliformes obtidos em alfaces após diferentes tipos de lavagem.....	19
Tabela 12 – Eficácia relativa de desinfeção com cloro na desinfeção de alfaces.....	23
Tabela 13 – Eficácia relativa de lavagens com dióxido de cloro na desinfeção de alfaces.....	24
Tabela 14 – Eficácia relativa do peróxido de hidrogénio na desinfeção de alfaces.....	25
Tabela 15 – Eficácia relativa da aplicação de ozono na desinfeção de alfaces.....	26
Tabela 16 – Eficácia relativa da aplicação de ácidos orgânicos na desinfeção de alfaces.....	28
Tabela 17 – Eficácia relativa de extratos de plantas na desinfeção de alface.....	29
Tabela 18 – Eficácia relativa de tratamento com água electrolisada na desinfeção de alface.....	30
Tabela 19 – Eficácia relativa da irradiação com raios x e γ na desinfeção de alface.....	31
Tabela 20 – Eficácia relativa do tratamento com UV (254 nm) na desinfeção de alfaces.....	32
Tabela 21 – Descrição do produto – alface	36
Tabela 22 – Composição química da alface crua.....	37
Tabela 23 – Determinação da significância do perigo.....	40
Tabela 24 – Identificação de perigos físicos.....	41
Tabela 25 – Resíduos de pesticidas encontrados em alface.....	42
Tabela 26 - Teores máximos de nitratos de acordo com o Regulamento (CE) n.º 1881/2006.	43
Tabela 27 – Identificação de perigos.....	44
Tabela 28 – Bactérias isoladas em alface crua.....	45
Tabela 29 – Microrganismos patogénicos isolados em alfaces.....	46
Tabela 30 – Identificação de perigos biológicos.....	47
Tabela 31 – Determinação de PCC com auxílio da árvore de decisão (produção primária não	

incluída).....	48
Tabela 32 – Classificação das medidas de controlo quanto à necessidade de serem geridas pelo(s) PPR(s) operacional(is) ou pelo plano HACCP.....	50
Tabela 33 – Programas pré-requisito operacionais genérico para vegetais consumidos crus.....	51
Tabela 34 – Contagens de microrganismos aeróbios totais a 30 °C (UFC/g).....	56
Tabela 35 – Contagens de <i>Escherichia coli</i> (UFC/g).....	58

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Efeito da sequência corte/desinfecção nos valores obtidos para <i>E. coli</i>	20
Figura 2 – Diferentes taxas de fixação bacteriana em alfaces.....	21
Figura 3 – Reação do cloro com a água de acordo com o pH e respetivas reações químicas.....	22
Figura 4 – Libertação de cloro em função do pH.....	23
Figura 5 – Processo de preparação das alfaces destinadas a serem consumidas cruas.....	38
Figura 6 – Perguntas da árvore de decisão para a determinação dos PCC.....	40
Figura 7 – Classificação das medidas de controlo quanto à necessidade de serem seguidas pelo(s) PPR(s) operacional(ais) ou pelo HACCP	49
Figura 8 – Lavagem e desinfecção de alfaces para amostragem.....	53

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Reduções obtidas na carga de microrganismos aeróbios totais a 30°C após desinfecção com água clorada.....	57
Gráfico 2 – Reduções obtidas na carga de microrganismos aeróbios totais a 30°C após desinfecção com água clorada combinada com vinagre.....	57
Gráfico 3 – pH mediante as diferentes combinações utilizadas de cloro, vinagre e água destilada na presença ou na ausência de alface em imersão.....	58

LISTA DE ABREVIATURAS

A.C.	Antes de Cristo
AEW	<i>Acid Electrolysed Water</i>
ALARA	<i>As Low as Reasonably Achievable</i>
BCIG	<i>5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl--D-Glucuronic Acid</i>
BPA	Boas Práticas Agrícolas
BPH	Boas Práticas de Higiene
BPF	Boas Práticas de Fabrico
CAC	<i>Codex Alimentarius Commission</i>
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EFSA	<i>European Food Safety Authority</i>
EUA	Estados Unidos da América
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
HACCP	<i>Hazard Analysis and Critical Control Points</i>
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
INSA	Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge
ISO	<i>International Organization for Standardization</i>
NP	Norma Portuguesa
PC	Ponto de Controlo
PCC	Ponto de Controlo Crítico
PPR	Programa de Pré-requisitos
PPRO	Programa de Pré-requisitos Operacionais
SCF	<i>Scientific Committee on Food</i>
TGA	<i>Tryptose Glucose Extract Agar</i>
UFC	Unidades Formadoras de Colónias
USDA	<i>United States Department of Agriculture</i>
UTL	Universidade Técnica de Lisboa
UV	<i>Ultravioleta</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>

1. INTRODUÇÃO

Esta dissertação é o resultado do estágio curricular que decorreu durante um período de quatro meses, entre 1 de Março de 2012 e 30 de Junho de 2012. O estágio foi realizado sob a orientação do Mestre André de Sousa Trêpa Magalhães e a coorientação da Professora Doutora Marília Catarina Leal Fazeres Ferreira. Durante o período de estágio foi acompanhado o trabalho diário do médico veterinário responsável pelas cantinas da UTL, foram avaliados os diferentes protocolos de lavagem e desinfecção de alfaces e a forma como geriam esta questão os diferentes sistemas de segurança dos alimentos implementados em cada uma das cantinas. A informação recolhida serviu de base ao trabalho prático desenvolvido.

Como componente práticas do estágio propusemo-nos efetuar:

- Uma revisão bibliográfica que permitisse obter uma visão abrangente das características microbiológicas da alface (*Lactuca sativa*) destinada a ser consumida crua, dos surtos associados ao seu consumo e dos diferentes tipos de desinfetantes disponíveis no mercado para a sua desinfecção;
- A aplicação de um sistema de segurança dos alimentos para alfaces destinadas a serem consumidas cruas em estabelecimentos de restauração coletiva;
- Um trabalho laboratorial para verificar a eficácia do cloro na desinfecção de alfaces, uma vez que se trata do desinfetante mais utilizado no setor alimentar e analisar a redução de carga microbiana obtida através da desinfecção de alfaces com uma solução alternativa composta por clorado associado a vinagre.

Com este fim foram efetuados três tratamentos higienizantes em alfaces: lavagem com água destilada, desinfecção com água clorada e desinfecção com água clorada combinada com vinagre. Posteriormente cada uma das amostras foi sujeita a uma análise laboratorial para os parâmetros microbiológicos: aeróbios totais 30 °C e *Escherichia coli*.

O desenho de um sistema de segurança sanitária aplicável a alfaces destinadas a serem consumidas cruas em estabelecimentos de restauração coletiva, permitiu detetar a relação estreita existente entre as características microbiológicas das alfaces e as boas práticas vigentes ao longo das diferentes etapas da cadeia produtiva (pré-colheita, colheita, pós-colheita). Trata-se de uma relação de dependência em que as fragilidades verificadas na segurança microbiológica de um determinado elo se repercutem sobre todos os outros elos da

cadeia a jusante. Deste modo é sugerida neste trabalho uma reflexão sobre a abrangência dos sistemas de segurança sanitária dos alimentos a toda a cadeia produtiva.

No decorrer do estágio, para além das actividades inerentes ao tema em estudo e com o objectivo de melhor compreender todo o processo de criação e implementação de um sistema de segurança dos alimentos num estabelecimento de restauração coletiva, procedeu-se ao acompanhamento dos dois bares da Faculdade de Medicina Veterinária e à sua introdução na metodologia HACCP.

2. PRODUÇÃO E PREPARAÇÃO PARA CONSUMO DE ALFACES

2.1 Práticas produtivas e fonte de microrganismos

Os vegetais compreendem uma gama diversificada de plantas (folhas, raízes, tubérculos, frutas). As práticas de produção, as condições de crescimento, a localização da parte comestível durante o crescimento (solo, superfície do solo, parte aérea), as condições de colheita e de processamento irão afectar a sua qualidade microbiana no momento de consumo. A produção pode ocorrer em campos abertos, estufas e em sistemas hidropónicos. Nos sistemas hidropónicos as plantas absorvem água e nutrientes através de um processo de recirculação de água. A cultura em estufa permite superar condições climáticas desfavoráveis e ampliar os períodos de produção, por este motivo é uma prática produtiva muito utilizada.

Os químicos, adubos orgânicos e materiais de compostagem são utilizados como nutrientes para as plantas. A composição microbiana das diferentes formas de fertilizante orgânico irá variar dependendo da sua origem e dos tratamentos a que são submetidos. Em produções hidropônicas a qualidade da água utilizada levanta preocupações sobre os tratamentos a que esta água é submetida.

A qualidade da água utilizada na irrigação de vegetais, os fertilizantes, os recipientes utilizados no seu transporte, estão relacionados com o potencial risco microbiológico que podem constituir, numa fase posterior. As tecnologias de irrigação são importantes para o controle da propagação de agentes patogênicos. O uso de irrigação gota-a-gota, em alternativa às irrigações por inundação e por aspersão, permite reduzir a potencial contaminação através de água e aerossóis. No entanto, também as fortes chuvas e ventos podem fornecer oportunidades para a transferência de microrganismos do solo para a superfície dos vegetais.

A globalização do mercado de alimentos levou não só à entrada de novos vegetais no mercado europeu como também à importação de vegetais oriundos de novos países com características e práticas produtivas distintas das utilizadas a nível europeu.

Uma vez que a lavagem e a desinfecção de vegetais para consumo crus não eliminam a totalidade dos microrganismos neles presentes, tem sido sustentada a ideia de que o melhor método de evitar a presença de microrganismos patogênicos será prevenindo a sua contaminação em primeiro plano (Issa-Zacharia *et al.*, 2010). Para tal, seria essencial a implementação da metodologia HACCP também no setor agrícola, assim como, a implementação de boas práticas agrícolas (BPA) uma vez que, *Escherichia coli* O157 e *Listeria monocytogenes* são usualmente introduzidos nas alfaces durante a fase de cultivo (Loncarevic *et al.*, 2005).

2.1.1 Medidas de controlo: pré-colheita, colheita e pós-colheita

Os mecanismos a partir dos quais os vegetais crus podem ser contaminados por microrganismos patogénicos são variados. Os efeitos da atividade da produção primária sobre a segurança microbiológica dos vegetais devem ser repensados e considerados de forma a identificar os pontos específicos nessas atividades que possam implicar um risco elevado de contaminação dos alimentos. Esta abordagem possibilitaria a adoção de medidas concretas para reduzir ao mínimo tal risco. Por este motivo, nos Estados Unidos, foram publicadas linhas orientadoras de boas práticas agrícolas e de manufaturação cuja aplicação permitiria a redução da contaminação destes alimentos por microrganismos patogénicos (FDA,1998; Johnston *et al.*, 2005).

2.1.1.1 Pré-colheita

Antes da colheita podem identificar-se como potenciais fontes de contaminação dos vegetais o solo, adubos e fertilizantes inadequadamente decompostos, a água de irrigação, a água utilizada para aplicação de fungicidas e insecticidas, pó, insetos, animais selvagens, domésticos, a presença de fezes e a manipulação humana (Buck *et al.*, 2003).

O solo é reservatório de inúmeros microrganismos. Além da microbiota não patogénica, o solo é também um reservatório de microbiota patogénica, de entre a qual, *E. coli*, *Bacillus cereus*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens* e *Listeria monocytogenes* (Issa-Zacharia *et al.*, 2010). As características microbiológicas dos vegetais são assim grandemente influenciadas pela proximidade da sua parte edível (raiz, fruto, folhas) ao solo e pela própria qualidade do solo de produção (Aycicek *et al.*, 2006). Num solo para produção de vegetais deveria tentar conhecer-se previamente a sua história. Seria importante averiguar qual a anterior utilização dada ao terreno, que tipo de culturas suportou, a que tipo de adubagem esteve sujeito. Desta forma poderiam ser resolvidos muitos problemas. Por exemplo, um solo utilizado anteriormente como zona de alimentação de animais ou como zona de pastoreio, terá necessariamente maior risco de contaminação fecal e como tal deveria existir um período de pousio ou este deveria ser utilizado para um outro tipo de cultura em que o vegetal não esteja diretamente em contacto com o solo (Watada & Qi, 1999).

Os fertilizantes tais como estrume, composto de origem humana e animal são comumente utilizados na produção de vegetais, especialmente em sistemas de produção biológica (Loncarevic *et al.*, 2005). A origem fecal destes fertilizantes já indicia o risco potencial de contaminação. Em especial os fertilizantes orgânicos são uma fonte potencial de agentes patogénicos humanos, tais como *Salmonella*, *E.coli* O157 e *Campylobacter* (Issa-Zacharia *et*

al., 2010) que podem persistir nos solos por várias semanas a meses. Também a *Listeria monocytogenes*, sendo ubiqüitária, pode estar presente nos estrumes compostos por plantas em decomposição, terra e estrume animal, podendo contaminar os vegetais em crescimento nos terrenos adubados (Loncarevic *et al.*, 2005). Se o período entre a aplicação de fertilizantes orgânicos e o momento da colheita for superior a 90 dias, poderá reduzir-se significativamente a possibilidade de ocorrência de doença causada por agentes patogênicos alimentares (Mukherjee *et al.*, 2004). Alguns estudos comprovam que vegetais cultivados com fertilizantes orgânicos com período de maturação inferior a 12 meses têm uma taxa de prevalência de *Escherichia coli* superior (Tabela 1) relativamente a explorações que utilizam fertilizantes com períodos de maturação superiores a 12 meses (Mukherjee *et al.*, 2004; Loncarevic *et al.*, 2005).

Tabela 1 - Comparação da prevalência de *E. coli* de acordo com o tempo de maturação dos fertilizantes utilizados (Mukherjee *et al.*, 2004)

Tempo de maturação dos estrumes	% Amostras positivas	Total de amostras
> 1 ano	1%	95
6 meses a 1 ano	25,3%	223

Por este motivo deverão ser mantidos registos do tipo de fertilizante utilizado assim como tempos mínimos de maturação, e intervalo mínimo de 90 dias entre a data da última fertilização e a data de colheita.

Em alternativa aos fertilizantes orgânicos é recomendada a utilização de fertilizantes inorgânicos, certificados como sendo livres de metais pesados.

A água de irrigação pode ser responsável pela transferência de microrganismos patogênicos para os vegetais. Os vegetais folhosos, como a alface, fornecem grandes superfícies de contacto com a água e facilitam por isso a fixação de microrganismos. As águas de irrigação devem por isso ser analisadas periodicamente e nelas deverá ser efetuada a pesquisa de microrganismos patogênicos e pesticidas. Fonseca (2005) reforça também a importância do intervalo de tempo entre a última irrigação e a data da colheita das alfaces da variedade *Iceberg*, identificando que quanto mais distante for a última irrigação relativamente à data de colheita, menor a contaminação microbiana das alfaces colhidas. O mesmo autor também constatou que este vegetal após queda de chuva pode ter um aumento de 1 a 2 log UFC/g na carga microbiana.

O cumprimento deste tipo de procedimentos poderia ser opcional, uma vez que nem todos os produtores terão capacidade de os efetuar, mas deveria ser criado um sistema de certificação que permitisse a diferenciação entre explorações cumpridoras e não cumpridoras destes requisitos. Assim, os restantes operadores da cadeia alimentar (restauração incluída) teriam mais informação para selecionar os produtores de vegetais. Por exemplo, Mukherjee *et al.* (2004) reportaram que em produções biológicas não certificadas 20% das alfaces produzidas eram positivas para *E. coli*, enquanto em produções biológicas certificadas a prevalência de *E. coli* era de apenas 3 - 4% (Tabela 2).

Tabela 2 - Comparação da presença de *Escherichia coli* em amostras de produção convencional, produção biológica certificada e não certificada (Mukherjee *et al.*, 2004)

	Prevalência de <i>Escherichia coli</i>					
	% (n.º de amostras positivas/ n.º de amostras)					
	Exploração Biológica				Exploração Convencional	
	Certificada		Não Certificada			
Tomate	14,3	(3/21)	2,8	(2/71)	0	(0/16)
Alface	0	(0/10)	30,8	(12/39)	16,7	(1/6)
Couve	0	(0/9)	13,3	(4/30)	0	(0/15)
Brócolos	0	(0/9)	19,0	(4/21)	0	(0/6)
Pepino	16,7	(1/6)	8,1	(3/37)	0	(0/12)
Cebola	0	(0/1)	37,5	(3/8)	0	(0/7)
Maça	0	(0/1)	0	(0/6)	0	(0/6)

Isto revela novamente a importância da implementação de sistemas de segurança dos alimentos que reduzam e previnam a contaminação dos vegetais e a certificação das empresas produtoras como cumpridoras destes princípios, resumidos na Tabela 3.

Tabela n.º 3 – Boas práticas a aplicar antes da colheita para garantir a qualidade microbiológica dos vegetais (SCF, 2002)

Antes da colheita:

Averiguar quais as anteriores utilizações do terreno em que se iniciará a produção, para garantir que contaminação fecal e compostos tóxicos, como pesticidas ou metais pesados não estarão presentes em níveis perigosos no futuro solo de produção.

Animais em pastoreio, animais em confinamentos ou outras fontes de contaminação fecal não devem estar presentes ou nas imediações dos terrenos de produção

Os fertilizantes não devem ter níveis detetáveis de microrganismos patogénicos. Para este fim é recomendado que seja garantido tempo adequado de maturação ou, em alternativa, a utilização de fertilizantes inorgânicos.

A água de irrigação deve ser analisada regularmente, não devendo conter agentes patogénicos ou níveis inaceitáveis de resíduos de pesticidas, metais pesados ou outros compostos tóxicos.

Manter registo documental de todos os fertilizantes, pesticidas, fungicidas e herbicidas utilizados. Garantir um intervalo de tempo de segurança entre as suas aplicações e a data de colheita dos vegetais.

Limpar e desinfetar os recipientes e ferramentas utilizadas nos campos de produção, de forma programada e regular.

2.1.1.2 Durante a colheita

Os danos mecânicos e a contaminação são as causas frequentes de perdas nesta fase (Caldas da Fonseca & Bernardo de Moraes, 2000). Os corretos cuidados de higiene podem diminuir as alterações que levam à degradação do produto pois reduzem o crescimento de microrganismos. Durante a colheita os vegetais podem ser contaminados essencialmente pelos manipuladores e pelos equipamentos utilizados. Por esse motivo, o manuseamento dos hortícolas durante a colheita deve ser efectuado com o máximo cuidado, evitando danos mecânicos e respeitando as condições de higiene essenciais. Os trabalhadores agrícolas não devem ser encarados só como agricultores mas também como manipuladores de alimentos.

Esta mão-de-obra quer seja contratada ou não, deverá ser alertada para estas questões através de formação, de demonstrações e de treinos de boas práticas de manuseamento e de higiene. Estes conhecimentos são imprescindíveis para evitar procedimentos incorretos que comprometam a qualidade do produto e que levam à sua posterior deterioração. Para facilitar o cumprimento das boas práticas de higiene em explorações de grande dimensão deverão ser instalados sanitários amovíveis e pontos de higienização das mãos próximo das zonas de colheita. A Tabela 4 resume os procedimentos a ter em conta durante a colheita para que as BPA sejam cumpridas.

Tabela 4 – Boas práticas na colheita (adaptado de Caldas da Fonseca & Bernardo de Moraes, 2000).

Durante a colheita:
Formar os trabalhadores para a seleção do produto a colher, técnicas de colher e para boas práticas de manuseamento;
Procedimentos higieno-sanitários. Os cuidados corretos de higiene podem diminuir as alterações que levam à degradação do produto pois reduzem o crescimento de microrganismos;
A colheita não deve ser realizada em períodos de chuva, porque o produto molhado é mais susceptível a apodrecer;
A colheita não deverá ser efectuada nas horas de maior calor. Quanto mais baixa for a temperatura do produto ao ser colhido mais fácil e económico será o seu arrefecimento posterior;
Se o destino do produto for um mercado próximo, este deve ser colhido logo de manhã, mas se o destino for um mercado mais distante então deverá ser colhido ao fim da tarde e o transporte efectuado durante a noite;
Se for detetada contaminação fecal durante a colheita devem ser tomadas medidas para impedir a colheita de quaisquer produtos hortícolas potencialmente contaminados;
A seleção deve ser criteriosa de forma a não gastar-se tempo e dinheiro com produto não vendável. O produto com danos por parasitas ou insectos não deve ser colhido;
Seleção de variedades com menor susceptibilidade aos danos mecânicos e aos choques térmicos, de forma a minimizar as perdas durante o período pós-colheita.

Relativamente aos equipamentos e recipientes de colheita, estes não devem ser colocados diretamente em contacto com o solo e é imperioso mantê-los limpos e em bom estado de conservação.

As características microbiológicas finais dos hortícolas dependerá também das condições climáticas, da data de colheita e do estado de maturação. O estado de maturação ótima à colheita é entendido como aquele que permitirá ao produto chegar ao mercado com as características desejadas pelo consumidor. Assim, as folhas, os caules, os rebentos e as inflorescências são colhidos ainda no seu estado de crescimento (Caldas da Fonseca & Bernardo de Moraes, 2000).

2.1.1.3 Após a colheita

Após a colheita a cadeia dos hortícolas frescos pode ser dividida em diferentes fases: arrefecimento, preparação, embalagem, armazenamento, transporte ou distribuição e comercialização. Nesta cadeia algumas fases podem não existir ou podem repetir-se.

A contaminação após a colheita pode dar-se em qualquer uma destas fases. A manipulação dos vegetais deve ser cuidadosa após a sua colheita, uma vez que os danos e roturas no tecido

vegetal expõem-nos ao ataque microbiano e às suas propriedades degradadoras (pectinolítica e proteolítica) (SCF, 2002).

Os materiais e superfícies que entrem em contacto com os vegetais, por exemplo os utilizados no transporte e a nível da aplicação de tecnologias de corte, descascar e ralar deverão ser higienizadas com regularidade e preferencialmente após cada utilização. Estes processos irão remover as barreiras naturais de proteção dos vegetais deixando em aberto a possibilidade de os contaminantes presentes nestas estruturas encontrarem um meio que favorece o seu crescimento (SCF, 2002).

Os materiais utilizados como contentores devem ser fáceis de desinfetar e as áreas de armazenamento devem ser protegidas de insetos, roedores, de lixo e sujidade assim como de qualquer outra fonte de contaminação. As câmaras de refrigeração em que os vegetais são mantidos, devem ser também elas higienizadas regularmente, uma vez que, *Listeria monocytogenes* pode proliferar a temperaturas de refrigeração, podendo contaminar os vegetais armazenados.

A Tabela 5 resume os procedimentos a ter em conta após a colheita para que as boas práticas sejam cumpridas.

Tabela 5 – Boas práticas pós colheita (Caldas da Fonseca & Bernardo de Moraes, 2000)

Após a colheita:

O rápido arrefecimento logo após a colheita para temperaturas próximas de 0°C é muito importante para a manutenção da qualidade da alface.

A alface não deve ficar exposta ao sol porque as folhas são muito sensíveis à perda de água.

A eliminação das folhas exteriores, o rápido arrefecimento e a manutenção da temperatura baixa são factores que diminuem o risco de contaminação bacteriana.

O acondicionamento é usualmente feito em grades plásticas. As alfaces são dispostos com o caule para cima, numa única camada e sem pressionarem os outros exemplares. O acondicionamento é feito logo no campo e esta embalagem é mantida durante toda a cadeia, para evitar danos.

A alface não deve ser guardada ou transportada com produtos que emitam etileno, pois este gás provoca-lhe uma lesão fisiológica. A exposição mesmo a baixas concentrações de etileno causa o aparecimento de pigmentos castanhos, em especial no caule. Se a exposição for mais severa, a pigmentação surge até nas folhas e por toda a alface.

As raízes, os tubérculos e os bolbos são pouco perecíveis e têm taxas de respiração baixas, em oposição as folhas são muito perecíveis e possuem taxas de respiração elevadas (Caldas da Fonseca & Bernardo de Moraes, 2000). Após a colheita o vegetal continua os processos de respiração e transpiração e já não pode repor as suas reservas nutricionais e de água, pelo que

sofre um envelhecimento que é seguido de apodrecimento. Por este motivo existem alguns fatores que influenciam a qualidade final das alfaces (Caldas da Fonseca & Bernardo de Moraes, 2000):

- a temperatura (desde a colheita até ao seu consumo): baixas temperaturas (0°-5°C) reduzem a taxa respiratória, bem como a atividade microbiológica e enzimática;
- a manutenção de uma humidade elevada (90-100%) na atmosfera envolvente do produto permite evitar ou diminuir a transpiração do produto, diminuindo as perdas de peso, o emurchecimento e as alterações sensoriais do produto;
- o etileno: este gás pode provocar a senescência de folhas (amarelecimento) e o desenvolvimento de pigmentos acastanhados na alface. Por isso durante a cadeia pós-colheita não devem ser expostas a produtos que o produzam (por exemplo fruta bem madura e podre).
- a limpeza e desinfeção dos equipamentos e superfícies que vão estar em contacto com a alface.

2.2 Microbiota e critérios microbiológicos

Os diferentes hortofrutícolas têm uma microbiota associada e muitos destes microrganismos irão estar também presentes no momento do consumo. Muitos destes microrganismos são, normalmente, não patogénicos para o ser humano. A maior parte das bactérias que se encontram na superfície das plantas são geralmente Gram-negativas e pertencem ao grupo das *Pseudomonas* ou das *Enterobacteriaceae* (SCF, 2002). Os tecidos internos dos vegetais, por seu lado, são normalmente considerados estéreis (SCF, 2002). No entanto, as bactérias podem estar presentes em número reduzido, em resultado da absorção de águas de irrigação ou de certos procedimentos de lavagem. Se estas águas estiverem contaminadas com microrganismos patogénicos estes podem também ser introduzidos (SCF, 2002). A sobrevivência e o crescimento de microrganismos contaminantes são afectados por factores intrínsecos e extrínsecos, tais como a composição de nutrientes, o pH, a presença de água, de fibras, o potencial redox, a temperatura, a presença de cortes à superfície que servem de acesso ao ataque microbiano.

A fim de contribuir para a protecção da saúde pública e evitar interpretações divergentes, foi necessário estabelecer critérios de segurança harmonizados em matéria de aceitabilidade dos alimentos, designadamente no que se refere à presença de certos microrganismos patogénicos. Neste sentido, os critérios microbiológicos dão orientações quanto à aceitabilidade dos alimentos e dos seus processos de fabrico, manuseamento e distribuição. A sua utilização deve fazer parte integrante da aplicação de procedimentos baseados no sistema HACCP e de

outras medidas de controlo da higiene. O Regulamento (CE) n.º 2073/2005 estabelece as regras de execução a cumprir pelos operadores das empresas do setor alimentar quando aplicarem as medidas de higiene gerais e específicas referidas no artigo 4.º do Regulamento (CE) n.º 852/2004. Importa referir que os valores de referência têm sofrido algumas alterações resultantes de pareceres do painel Científico dos Riscos Biológicos da Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (Regulamento (CE) n.º 1441/2007 da Comissão, Regulamento n.º 365/2010 da Comissão e Regulamento n.º 1086/2011 da Comissão).

O Regulamento N.º 1441/2007 indica se o processo de produção funciona de modo aceitável e estabelece um valor de contaminação indicativo, acima do qual se tornam necessárias medidas corretivas para preservar a higiene do processo em conformidade com a legislação alimentar (não é aplicável aos produtos colocados no mercado). A legislação comunitária define critérios microbiológicos de segurança e higiene dos processos. O Regulamento N.º 1086/2011 define a aceitabilidade de um produto ou de um lote de produtos colocados no mercado.

As análises microbiológicas têm várias limitações, nomeadamente o facto de microrganismos patogénicos não serem facilmente postos em evidência nos meios e nas condições de cultura clássica dos laboratórios (vírus, parasitas); os resultados das análises estarem diretamente relacionados com o modo de amostragem e método de análise; o custo significativo das análises e prazos longos para a obtenção de respostas; as análises não garantirem, por si só, a inocuidade dos alimentos (possibilidade de falso negativo); os microrganismos raramente estarem distribuídos de forma homogénea num alimento, nenhuma análise permite verificar na sua totalidade a microbiota presente porque os alimentos comportam uma microbiota muito diversificada (Jones *et al.*, 2004).

As contagens efetuadas para controlo microbiológico de produtos hortícolas crus, usualmente incluem a avaliação de aeróbios totais a 30° C e de *Escherichia coli*, como indicadores higio-sanitários. *Enterobacteriaceae* não são utilizadas como indicador de qualidade microbiológica dos produtos hortícolas devido ao facto de existirem em níveis elevados, uma vez que fazem parte da sua microbiota nativa (Food Standards, 2001; NSW Food Authority, 2009).

As contagens de microrganismos totais a 30°C têm por objetivo determinar a carga microbiológica aeróbia, mesófila e viável no produto a analisar. Neste tipo de ensaio determina-se a presença de bactérias, bolores e leveduras, englobando em simultâneo agentes responsáveis por alterações dos alimentos e microrganismos patogénicos - esta microbiota exige as mesmas condições de crescimento do que a maioria das espécies patogénicas. Esta determinação tem um significado importante em microbiologia alimentar por ser o melhor método de avaliar as características microbiológicas gerais dos alimentos. Fornece informação

útil com base num método rápido e fácil de realizar. Embora a informação que resulta desta técnica não garanta a segurança sanitária dos produtos, já que, para tal é necessária a pesquisa de microrganismos patogénicos, a sua aplicação está generalizada, pois a presença de uma microbiota muito numerosa pode tornar o alimento impróprio para consumo, diminuir o seu valor nutricional e conduzir à sua decomposição e possível formação de produtos tóxicos, como a histamina (Food Standards, 2001).

As contagens de *Escherichia coli*, têm por objetivo evidenciar uma possível contaminação fecal, daí ser referido como critério de higiene no Regulamento (CE) n.º 2073/2005 para produtos e hortícolas pré-cortados prontos para consumo. *E. coli* é comensal do intestino do Homem e dos animais de sangue quente. Devido a este facto considera-se um bom índice de contaminação fecal. Esta contaminação evidencia que o alimento não foi cultivado, transportado, conservado ou preparado em condições de higiene adequadas. Sendo assim, a sua presença no alimento traduz uma contaminação indesejável, possivelmente de origem fecal, e um risco da presença de agentes patogénicos intestinais. A presença de *E. coli* pode ser indicador da presença de *Salmonella* spp. (Krometis *et al.*, 2010).

Em Portugal, o Instituto Nacional de Saúde (INSA) utiliza como referência os valores expressos na Tabela 6 (Santos *et al.*, 2005) para alimentos prontos a comer e preparados em estabelecimento de restauração. Os alimentos são colocados em três grupos: o primeiro é constituído por alimentos cujos ingredientes se encontram totalmente cozinhados; o segundo é composto por misturas de alimentos crus, cozinhados ou com microbiota específica própria; o terceiro engloba saladas, vegetais e frutos crus, tais como, alface, tomate, cenoura, couve roxa, salada de frutas e fruta crua laminada.

Tabela 6 – Valores guia para avaliação da qualidade microbiológica de alimentos cozinhados prontos a comer (Santos *et al.*, 2005)

Microrganismo	Grupo de alimentos	ufc/g			
		Satisfatório	Aceitável	Não satisfatório	Inaceitável / potencialmente perigoso
Microrganismos a 30°C	1, 2, 3	$\leq 10^2$ $\leq 10^3$ $\leq 10^4$	$>10^2 \leq 10^4$ $>10^3 \leq 10^5$ $>10^4 \leq 10^6$	$>10^4$ $>10^5$ $>10^6$	NA NA NA
Leveduras	1, 2, 3	$\leq 10^2$ $\leq 10^2$	$>10^2 \leq 10^4$ $>10^2 \leq 10^5$	$>10^4$ $>10^5$	NA NA
Bolores	1, 2, 3	≤ 10 $\leq 10^2$	$>10 \leq 10^2$ $>10^2 \leq 10^3$	$>10^2$ $>10^3$	# #
Coliformes totais	1, 2, 3	≤ 10 ≤ 10 $\leq 10^2$	$>10 \leq 10^2$ $>10 \leq 10^3$ $>10^2 \leq 10^4$	$>10^2$ $>10^3$ $>10^4$	NA NA NA
<i>E. coli</i>	1, 2, 3	≤ 10 ≤ 10	NA $>10 \leq 10^2$	≥ 10 $\geq 10^2$	NA NA
<i>Listeria spp.</i>	1, 2, 3	$<10^2$	NA	$\geq 10^2$	NA
Anaeróbios sulfito redutores	1, 2, 3	≤ 10	$>10 \leq 10^3$	$>10^3 \leq 10^4$	$\geq 10^4$
<i>Staphylococcus coagulase positiva</i>	1, 2, 3	$<10^2$	NA	$\geq 10^2 \leq 10^4$	$>10^4$
<i>Bacillus cereus</i>	1, 2, 3	$\geq 10^2$	$>10^2 \leq 10^3$	$>10^3 \leq 10^5$	$\geq 10^5$
<i>Clostridium perfringens</i>	1, 2, 3	<10	$\geq 10 \leq 10^3$	$>10^3 \leq 10^4$	$\geq 10^4$
<i>Salmonella spp.</i>	1, 2, 3	Ausente em 25g			Presente em 25g
<i>Listeria monocytogenes</i>	1, 2, 3	Ausente em 25g	Presente em 25g $<10^{2\#}$		$\geq 10^2$
<i>Campylobacter spp.</i>	1, 2, 3	Ausente em 25g			Presente em 25g
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	1, 2, 3	Ausente em 25g			Presente em 25g
<i>Yersinia enterocolitica</i>	1, 2, 3	Ausente em 25g			Presente em 25g

Equacionado caso a caso

As diferentes formas de produção, as condições de crescimento, assim como a localização das suas partes edíveis (no solo, junto ao solo ou afastados dele) não são tidas em conta embora influenciem grandemente as contagens obtidas e o seu estado microbiológico no momento do consumo (Aycicek *et al.*, 2006).

Num estudo realizado sobre a microbiota presente em vegetais constatou-se que a cenoura ralada, os espinafres e a alface foram os vegetais que apresentaram resultados com contagens mais altas (aeróbios totais, bolores e leveduras), enquanto as endívias apresentam as contagens mais baixas (Abadias *et al.*, 2008). Os resultados obtidos podem explicar-se por se tratar de uma raiz, em contacto permanente com o solo, fertilizantes e águas de irrigação (Tabelas 7, 8 e 9). Por seu lado, os espinafres e a alface são culturas de superfície mas, ao terem folhas largas entram facilmente em contacto com o solo e água de irrigação.

O mesmo estudo também revela a ausência de microrganismos patogénicos (*E. coli*, *Salmonella* e *L. monocytogenes*) na cenoura ralada e endívias pesquisadas.

Tabela 7 - Resultados das contagens de aeróbios totais nas amostras analisadas (Abadias *et al.*, 2008).

Porcentagem (%) de amostras no intervalo indicado						
	N	<10 ⁵	10 ⁵ -10 ⁶	10 ⁶ -10 ⁷	10 ⁷ -10 ⁸	>10 ⁸
Vegetais recém-cortados	236	1,7	10,2	34,3	47,9	5,9
Cenoura	18	0	0	11,1	55,6	33,3
Alface	29	6,9	37,9	27,6	27,6	0
Espinafres	10	0	0	10,0	80,0	10,0
Endívias	21	9,5	19,0	66,7	4,8	0
Fruta recém cortada (maçã, pêssgo, laranja e manga)	21	90,4	4,8	0	4,8	0

N = número de amostras

Tabela 8 - Resultados das contagens de bolores e leveduras (Abadias *et al.*, 2008)

Porcentagem (%) de amostras no intervalo indicado					
	N	<10 ⁵	10 ⁵ -10 ⁶	10 ⁶ -10 ⁷	10 ⁷ -10 ⁸
Vegetais recém-cortados	236	36,9	45,3	14,8	3
Cenoura	18	5,6	33,3	50,0	11,1
Alface	29	75,9	17,2	6,9	0
Espinafres	10	50,0	40,0	10,0	0
Endívias	21	71,4	28,9	0	0
Fruta recém cortada (maçã, pêssgo, laranja e manga)	21	95,2	4,8	0	0

N = número de amostras

Tabela 9 – Resultados da incidência de agentes patogénicos nas amostras pesquisadas (Abadias *et al.*, 2008).

Porcentagem (%) de amostras no intervalo indicado				
	N	<i>E. coli</i>	<i>Salmonella</i>	<i>L. monocytogenes</i>
Vegetais recém-cortados	236	11,4	1,7	ND
Cenoura	18	ND	ND	ND
Alface	29	3,4	3,4	3,4
Espinafres	10	20,0	10	ND
Endívias	21	ND	ND	ND
Fruta recém-cortada (maçã, pêssgo, laranja e manga)	21	ND	ND	ND

N = número de amostras

ND = não detetada

Se considerarmos os resultados das contagens de microrganismos totais presentes nos vegetais constatamos que estas variam usualmente entre 10^4 e 10^8 UFC/g (SCF, 2002) de acordo com as variações climáticas, sazonalidade e, sobretudo, com a porção do vegetal em questão (raiz, caule, fruto). As diferentes contagens não ocorrem só entre diferentes vegetais, um mesmo vegetal pode apresentar diferenças consideráveis. Adams *et al.* (1989) comprovou que as folhas externas da alface apresentam contagens superiores em aproximadamente 1 log relativamente às folhas das camadas mais interiores.

Os valores obtidos nas contagens de aeróbios totais são importantes como indicadores de validade e qualidade dos vegetais para consumo, uma vez que estes microrganismos são responsáveis pela sua deterioração. A este propósito, cerca de dois terços da deterioração sofrida pelos vegetais será causada por fungos filamentosos pertencentes aos géneros *Penicillium*, *Aspergillus*, *Sclerotinia*, *Botrytis* e *Rhizopus* (SCF, 2002) cuja atividade celulolítica ou pectinolítica causa amolecimento e enfraquecimento das estruturas da planta que, em circunstâncias normais, são importantes barreiras para impedir o crescimento de microrganismos patogénicos.

2.3 Toxinfecções alimentares devido ao consumo de vegetais crus

Os produtos hortofrutícolas não estão em geral associados a toxinfecções alimentares e transmitem ao consumidor uma imagem de alimentos seguros. Os surtos são muitas vezes de contornos desconhecidos porque existem falhas na rastreabilidade e sistemas de notificação demasiado complexos, limitam uma avaliação mais abrangente do envolvimento dos vegetais crus como fonte de infeções de origem alimentar (SCF, 2002). Em 50% dos casos reportados de toxinfecção alimentar, o agente não chega a ser identificado (Buck *et al.*, 2003). Muito embora os surtos ocorridos devido ao consumo de vegetais crus variasse entre 0,5 e 4,2% do total de surtos reportados entre 1988 a 1997, o seu valor tem vindo a aumentar ao longo dos últimos anos (Hedberg *et al.*, 1993; SCF, 2002; Johnston *et al.*, 2005; Issa-Zacharia *et al.*, 2010). Entre 1990 e 2001 ocorreu um total de 148 casos associados a produtos vegetais crus, correspondendo este valor a 9% de todos os surtos reportados (Mukherjee *et al.*, 2004). Entre estes, os surtos melhor caracterizados são os de origem bacteriana, nomeadamente associados a *Salmonella*, *Escherichia coli* O157:H7, *Shigella* e *Listeria monocytogenes* (SCF, 2002; Johnston *et al.*, 2005).

Apesar do envolvimento dos vegetais ter menor expressão do que os alimentos de origem animal, o surto recente de uma estirpe enterohemorrágica de *E.coli* na Alemanha (EFSA,

2011), as alterações nos hábitos alimentares com aumento do consumo de vegetais a nível mundial (Buck *et al.*, 2003), a crescente importância dada à integração de vegetais como parte de uma dieta saudável, assim como a enorme popularidade atingida na Europa pelos produtos vegetais prontos a consumir, tornaram necessária uma nova reflexão sobre este tema.

A Tabela 10 apresenta os agentes patogénicos associados a doença alimentar causada pelo consumo de vegetais crus. As bactérias patogénicas que causam maior preocupação em vegetais destinados a serem consumidos crus são *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Typhimurium (Yang *et al.*, 2003; Beuchat, 1996). Entre estes, *Salmonella* e *Campylobacter* são os agentes etiológicos notificados com maior frequência (Issa-Zacharia *et al.*, 2010).

Numa perspetiva mais abrangente e sabendo que a microbiota associada aos vegetais é muito variada, para além de bactérias, também vírus (*Norwalk*) e protozoários (*Cryptosporidium* spp., *Cyclospora* spp.) são frequentemente associados a surtos relacionados com produtos hortícolas (Tabela 10).

A alface, em particular, tem sido associada a surtos de *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* spp. (Magnuson *et al.*, 1990), *Listeria monocytogenes* (Steinbruegge *et al.*, 1988), *Shigella sonnei* (Davis *et al.*, 1988) e vírus da Hepatite A (Buck *et al.*, 2003) tal como apresentado na Tabela 10. Para este vegetal, a FDA reportou que 2 em cada 116 amostras de alfaces importadas eram positivas a microrganismos patogénicos, mais especificamente a *Salmonella* e *Shigella* (FDA 2001; Rajkowski & Fan, 2008) e que em 142 amostras de alfaces, produzidas nos EUA, 1 era positiva para *Salmonella* (FDA 2003; Rajkowski & Fan, 2008).

Tabela 10 – Exemplos de agentes patogênicos associados a doenças veiculadas pelo consumo de vegetais crus (Adaptado de WHO, 1998; SCF, 2002; Buck *et al.*, 2003; CDC, 2010; Issa-Zacharia *et al.*, 2010; EFSA, 2011; CDC, 2012).

Agente	Alimento implicado	Referência
<i>Campylobacter jejuni</i>	Pepino	Kirk <i>et al.</i> (1997)
<i>Campylobacter jejuni</i>	Alface	WHO (1998)
<i>Campylobacter jejuni</i>	Alface	WHO (1998)
<i>Campylobacter jejuni</i>	Alface	WHO (1998)
<i>Campylobacter</i> spp.	Alface	EFSA (2011)
<i>Cyclospora cayatenesis</i>	Alface	WHO (1998)
<i>Clostridium botulinum</i>	Salada de legumes	PHILS (1978)
<i>Cryptosporidium parvum</i>	Cebolinho	WHO (1998)
<i>E. coli</i> O157:H7	Alho-porro	EFSA (2011)
<i>E. coli</i> O157:H7	Salada mista	EFSA (2011)
<i>E. coli</i> O157:H7	Alface iceberg	WHO (1998)
<i>E. coli</i> O157:H7	Alface romaine	WHO (1998)
<i>E. coli</i> O157:H7	Alface iceberg	WHO (1998)
<i>E. coli</i> O157:H7	Rabanete	WHO (1996)
<i>E. coli</i> O157:H7	Cenoura ralada	WHO (1998)
<i>E. coli</i> O157:H7 ⁽¹⁾	Rabanete	Issa-Zacharia <i>et al.</i> , 2010; Buck, <i>et al.</i> , 2003; SCF (2002)
<i>E. coli</i> O157:H7	Alface romaine	CDC (2012)
<i>E. coli</i> O157:H7	Alface romaine	CDC (2010)
<i>Fasciola hepática</i>	Agrião	Hardman (1970)
<i>Giardia lamblia</i>	Alface	WHO (1998)
<i>Giardia lamblia</i>	Cenoura	Mints <i>et al.</i> (1992)
Vírus Hepatite A	Agrião	WHO (1998)
Vírus Hepatite A	Alface iceberg	WHO (1988)
Vírus Hepatite A	Alface iceberg	Rosenblum <i>et al.</i> (1990)
Vírus Hepatite A	Tomate picado	WHO (1998)
<i>Salmonella entérica</i>	Tomate	Cummings <i>et al.</i> , (1999)
<i>Salmonella</i> Typhimurium	Tomate	WHO (1998)
<i>Shigella flexneri</i>	Cebolinho	WHO (1998)
<i>Shigella flexneri</i>	Salada mista	Dunn <i>et al.</i> (1995)
<i>Shigella sonnei</i>	Alface iceberg	WHO (1998)
<i>Shigella sonnei</i>	Alface iceberg	Kapperud <i>et al.</i> (1995)

(1) 11000 pessoas afetadas, 6000 casos confirmados por cultura, morreram três crianças.

2.4 Lavagem e desinfecção

2.4.1 Fatores que afetam a eficácia da lavagem e da desinfecção

A lavagem é um processo físico que remove terra e sujidade que os vegetais possam conter. Estão disponíveis no mercado diversos tipos de equipamentos para lavagem de vegetais, incluindo mecanismos de agitação de água, tanques de água parada, sistemas de escovas. De acordo com SCF (2002) as reduções na carga microbiana obtidas através da lavagem variam entre 0,1 a 1 log.

A desinfecção por seu lado corresponde à redução do número de microrganismos, mediante a utilização de agentes químicos e métodos físicos inócuos para os alimentos e para a saúde humana. Um bom desinfetante caracteriza-se por ser efetivo a baixas concentrações e de rápida atuação, por possuir um largo espectro de ação, ser solúvel em água, biodegradável, fácil de enxaguar, não corrosivo, inócuo e economicamente acessível (CDC, 2008).

Tanto a lavagem como a desinfecção são fundamentais para garantir as exigências estéticas e para assegurar a qualidade dos vegetais face às contaminações física, biológica e química. Para maximizar a redução da carga microbiana através da lavagem e da desinfecção é necessário compreender e superar os mecanismos de resistência à remoção e inativação bacteriana. O sucesso deste tratamento implica um conhecimento profundo dos locais de adesão bacteriana, da capacidade de adesão específica de cada microrganismo, das suas interações com a superfície dos vegetais e com os microrganismos que constituem a microbiota natural, da capacidade de formação de biofilmes assim como o conhecimento da sensibilidade bacteriana aos diferentes agentes de desinfecção (Sapers, 2001).

Quando ocorre a fixação bacteriana a superfícies vegetais, estas tendem a localizar-se em poros, recortes, fissuras ou irregularidades naturais das superfícies vegetais intactas, ou nas que se encontrem de algum modo danificadas. Estas zonas constituem um abrigo que permite às bactérias escapar à lavagem e ao contacto com o agente desinfetante tornando-as difíceis de eliminar. Uma vez fixadas a uma superfície vegetal, as bactérias *E. coli* O157:H7, *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes* têm capacidade de se incorporarem em biofilmes, matriz polissacarídea extracelular que junta e agrega bactérias e células criando uma forte aderência à superfície do vegetal (Sapers, 2001).

Foi também demonstrada a existência de capacidade de infiltração no tecido vegetal do tomate por algumas bactérias patogénicas, entre as quais, *Salmonella* Montevideo e *E. coli* O157:H7 (Sapers, 2001). Estes casos confirmam que a eficácia da desinfecção e da lavagem dependem do intervalo de tempo que decorre desde a contaminação por microrganismos, e o

momento em que são efetuadas a lavagem e a desinfecção dos vegetais, uma vez que a fixação bacteriana é reforçada à medida que este intervalo de tempo aumenta. Estudos efetuados com inoculação artificial de *E. coli* indicam que quando o intervalo entre a inoculação e a lavagem é de 30 minutos, a lavagem leva a uma redução na população microbiana de 1 log. Contudo, em lavagens efetuadas 24 horas após a inoculação de *E. coli*, a maioria das bactérias encontravam-se firmemente fixadas e não foram removidas pela lavagem. Em desinfecções com cloro (1000 ppm) efetuadas 30 minutos após a inoculação obtiveram-se reduções na ordem de 3 log. Quando o intervalo entre a desinfecção e a inoculação foi de 72 horas após a inoculação obtiveram-se reduções inferiores a 1 log (Sapers, 2001).

A temperatura da água de lavagem por seu lado não influenciou os resultados obtidos na lavagem de alfaces. Rajkowski & Fan (2008) constataram que não existe diferença nas contagens de aeróbios totais, obtidas em alface iceberg lavada em água fria ou quente (Tabela 11).

Tabela 11 – Contagem de aeróbios totais e coliformes obtidos em alfaces após diferentes tipos de lavagem (Rajkowski & Fan, 2008).

	Amostra de alface	População (log ufc/g)	
		Aeróbios	Coliformes
1	Não lavada †	5,66 ± 0,4	5,01 ± 0,08
	Lavada com água fria ‡	4,92 ± 0,07	4,3 ± 0,03
	Lavada com água quente §	5,02 ± 0,20	4,3 ± 0,30
2	Não lavada †	4,0 ± 0,01	4,0 ± 0,01
	Lavada com água fria ‡	3,63 ± 0,70	3,86 ± 0,7
	Lavada com água quente §	4,0 ± 0,01	> 3,0

† - Alface sem nenhuma lavagem.

‡ - Alface lavada com água fria a 5°C durante 3 minutos.

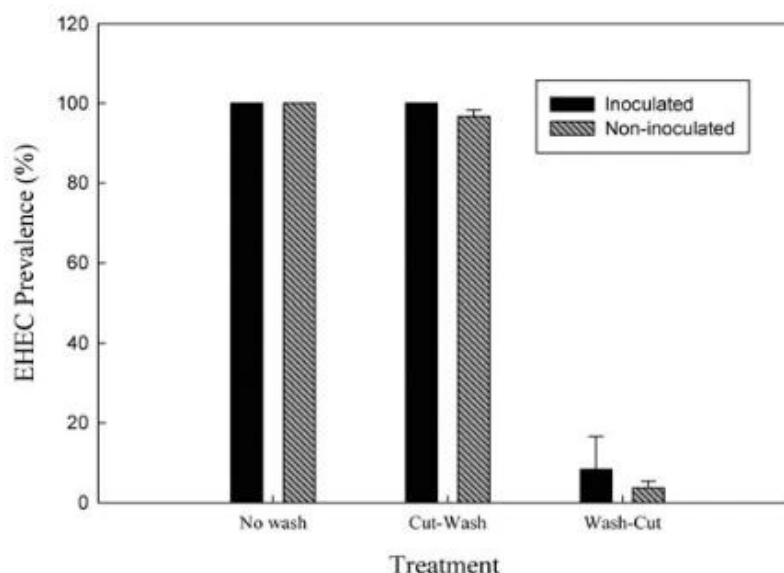
§ - Alface lavada com água quente a 47°C durante 2 minutos e água fria a 5°C durante 1 minuto

Quanto à duração da lavagem e da desinfecção de alfaces esta funciona de forma distinta para cada um dos casos. No caso da lavagem quando se aumenta a sua duração de 5 para 30 minutos a redução na carga microbiana obtida aproxima-se dos valores obtidos com a desinfecção. De acordo com Adams *et al.* (1989) a desinfecção de alfaces com solução clorada (100 ppm) mostrou que a duração da desinfecção teve pouca relevância na redução da carga microbiana, uma vez que com aumento do tempo de desinfecção de 5 para 30 minutos não se alterou o valor das contagens obtidas.

Todos estes factores devem ser tidos em conta na escolha dos protocolos de mitigação. A importância do protocolo de desinfecção escolhido é também reforçada pela pesquisa efetuada

por Takeuchi & Frank (2000). Estes reportaram que *E. coli* O157:H7 e *L. monocytogenes* se fixam maioritariamente a arestas, zonas danificadas e com cortes nas folhas de alface, enquanto *Salmonella* Typhimurium tem igual capacidade de fixação em folhas de alface intactas ou danificadas. Por este mesmo motivo é defendido por Lou *et al.* (2010) que a desinfecção com cloro é mais eficiente na redução microbiana quando aplicada em folhas de alface inteiras (redução superior em 1,3 log para *E. coli* e 0,8 log para aeróbios totais). Assim sendo, tanto em alfaces prontas a servir como em alfaces para embalar em atmosfera modificada, o protocolo de desinfecção deverá especificar que a desinfecção dos vegetais deve ser efetuada antes do seu corte, como forma de facilitar a remoção bacteriana e potenciar o poder desinfetante do cloro (Figura 1).

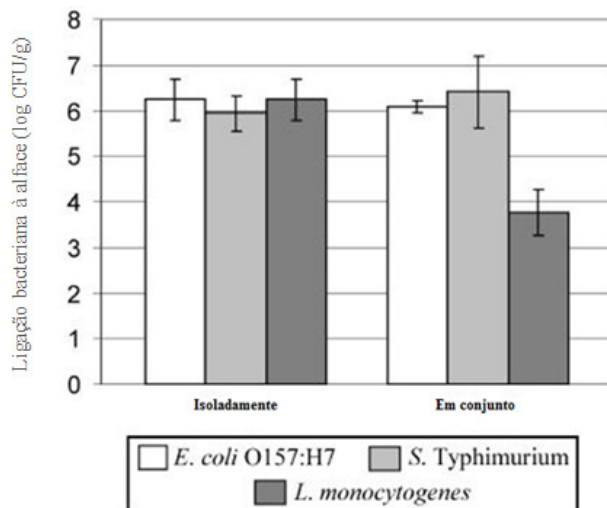
Figura 1 – Efeito da sequência corte/desinfecção nos valores obtidos para *E. coli*. (Lou *et al.*, 2010).



A relação entre os microrganismos patogénicos e a microbiota nativa também é de especial interesse, uma vez que, alguns autores sugerem que reduzindo ou eliminando a microbiota nativa através da desinfecção ou através de atmosferas modificadas, altera-se um equilíbrio pré-atingido, podendo, dessa forma, potenciar-se a ação de agentes patogénicos (Parish *et al.*, 2003). Yang *et al.* (2003), demonstraram que as bactérias *E. coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium e *Listeria monocytogenes*, quando inoculadas separadamente em folhas de alface apresentam índices de fixação semelhante (Figura 2). No entanto, quando as três bactérias são inoculadas em conjunto, e portanto, existindo competição entre elas, estes valores variaram. *Escherichia coli* e *Salmonella* apresentam os mesmos valores de fixação às folhas de alface, enquanto *L. monocytogenes* apresentou uma redução drástica na sua

capacidade de fixação (Yang *et al.*, 2003). Por este mesmo motivo a competição entre microrganismos deve ser considerada.

Figura 2 – Diferentes taxas de fixação bacteriana em alfices (Yang *et al.*, 2003).



2.5.2 Desinfetantes químicos

Existe no mercado um vasto leque de desinfetantes químicos. A sua ação e eficiência depende de inúmeros fatores, entre os quais, a concentração utilizada, o tempo de exposição, temperatura, pH, do vegetal a desinfetar e da própria sensibilidade dos microrganismos alvo (Issa-Zacharia *et al.*, 2010).

De entre os desinfetantes químicos destacam-se o cloro, dióxido de cloro, peróxido de hidrogénio, ozono, ácidos orgânicos e os recentemente estudados extratos de plantas (Kim *et al.*, 2011) e culturas protetoras. Destes, o cloro é o desinfetante químico mais utilizado na desinfecção de vegetais na indústria alimentar (Sapers, 2001; Tirpanalan *et al.*, 2011).

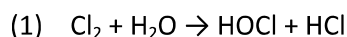
2.4.2.1 Cloro

O cloro foi utilizado pela primeira vez como desinfetante por Ignac Semmelweis em 1846, na maternidade do Hospital Geral de Viena. A solução de cloro então utilizada serviria para a desinfecção das mãos antes da manipulação dos recém-nascidos. Atualmente o cloro é o desinfetante mais amplamente utilizado na indústria alimentar, devido ao seu reduzido custo, fácil utilização e eficácia (Parish *et al.*, 2003; Ölmez & Kretzchmar, 2009). A sua utilização permite uma redução na população microbiana entre 1 a 2 log (Adams *et al.*, 1989; Sapers,

2001) sendo que as bactérias Gram-positivas apresentam maior resistência (Virto *et al.*, 2005). Existem vários outros parâmetros que influenciam a eficácia do cloro, entre os quais o pH, o tempo de lavagem, a temperatura ou a quantidade de matéria orgânica presente.

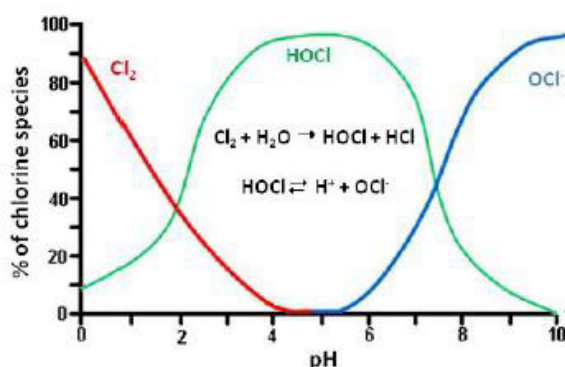
Foi comprovado experimentalmente que pequenas concentrações de ácido hipocloroso têm ação antibacteriana. Estas descobertas levaram à formulação de hipóteses que sugerem que a morte bacteriana se deve não só à capacidade oxidativa do ácido hipocloroso mas, também, ao seu reduzido tamanho molecular que lhe confere a capacidade de penetração na parede bacteriana e, à reação química que ocorre no protoplasma entre o ácido hipocloroso e a enzima triosefosfato dihidrogenase, essencial na oxidação da glicose e, portanto, na atividade do metabolismo celular (Meyer, 1994).

Uma vez dissolvido em água o cloro reage primeiramente com os compostos orgânicos, que o inativam. O restante cloro em contacto com a água é rapidamente hidrolisado, de acordo com as reações seguintes:



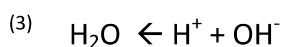
Forma-se assim ácido hipocloroso (HOCl) e ião hipoclorito (OCl^-). Estes dois compostos são usualmente denominados por cloro livre ou cloro disponível. No entanto, o poder desinfetante do ião hipoclorito é baixo e é o ácido hipocloroso que apresenta grande poder desinfetante uma vez que por ser electricamente neutro e de baixo peso molecular penetra com extrema facilidade na membrana celular (Parish *et al.*, 2003). Tal como representado nas Figuras 3 e 4 as concentrações de ácido hipocloroso e de ião hipoclorito dependem do pH (Carvalho, 2008).

Figura 3 - Reação do cloro com a água de acordo com o pH e respetivas reações químicas (Carvalho, 2008).



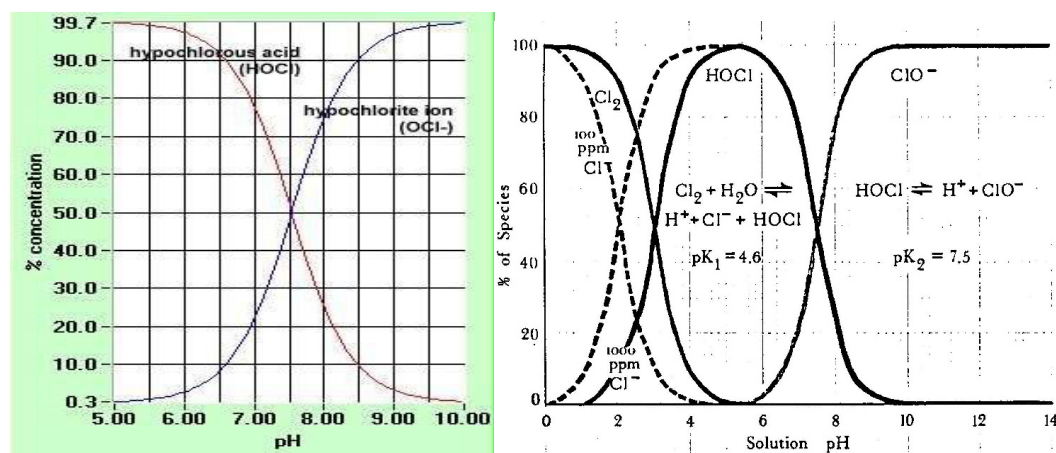
O ácido hipocloroso é um ácido fraco, o que significa que pode sofrer dissociação parcial para formar hidrogénio (H^+) e hipoclorito (OCl^-) se o pH se alterar.

À medida que o pH da água clorada aumenta, haverá menos iões H^+ e mais OH^- disponível. Nestas condições, o sentido da reação é alterado para a direita ocorrendo quebra de ligações do ácido hipocloroso ($HOCl$). O H^+ resultante desta quebra de ligações (equação 3) irá reagir com o OH^- disponível devido ao aumento de pH, formando-se água (Carvalho, 2008).



Da quebra de ligações do ácido hipocloroso resulta também OCl^- , cuja ação desinfetante é desprezável. Assim, valores de pH altos diminuem o poder de desinfecção do cloro (Hiisvirta *et al.*, 1994; Meyer, 1994). Por oposição, valores baixos de pH aumentam a concentração do ião H^+ na solução clorada e conferem por este motivo maior poder de desinfecção ao cloro (Figura 4).

Figura 4 – Libertação de cloro em função do pH (IC Controls, 2005).



O cloro total corresponde ao somatório de cloro que reage com a matéria orgânica, nitratos e amónia e que não está disponível para a desinfecção (cloro combinado) com o restante cloro (cloro livre) que tem poder desinfetante.

A eficácia relativa do cloro na desinfecção de alface encontra-se descrita na Tabela 12.

Tabela 12 – Eficácia relativa da utilização de cloro na desinfecção de alfaces (adaptado de Tirpanalan *et al.*, 2011).

Tipo de microrganismo	Concentração de cloro livre (ppm)	Tempo de aplicação (minutos)	Redução obtida (\log_{10} ufc/g)	Referências
<i>Yersinia enterocolitica</i>	100	10	~ 2	Escuerda <i>et al.</i> , 1999
	300		~ 3	Escuerda <i>et al.</i> , 1999
Aeróbios totais	200	5	1,3	Vandekinderen <i>et al.</i> , 2009
<i>Salmonella</i> Typhimurium	200	10	~ 1	Kondo <i>et al.</i> , 2006
<i>Listeria monocytogenes</i>	100	1	0,7	Jongen, 2005
	200	10	1,7	Zhang & Farber, 1996
<i>E. coli</i> O157:H7	200	10	1,2	Kondo <i>et al.</i> , 2006
	300	3	~ 0,5	Niemira <i>et al.</i> , 2007
	600	3	~ 0,5	Niemira <i>et al.</i> , 2007
<i>Staphylococcus aureus</i>	200	10	1,4	Kondo <i>et al.</i> , 2006

Um dos inconvenientes da utilização do cloro na desinfecção de vegetais é precisamente a sua inativação pela presença de matéria orgânica (cloro combinado). O outro principal inconveniente da sua utilização é a formação de produtos carcinogénicos resultantes da reação do cloro com a amónia e compostos de nitrogénio (Sapers *et al.*, 2001; Tirpanalan *et al.*, 2011). Consequentemente foram implementadas restrições para a utilização de cloro por parte das entidades reguladoras nos Estados Unidos e em alguns países europeus, nomeadamente Alemanha, Suíça, Holanda e Bélgica (Sapers, 2001; Issa-Zacharia *et al.*, 2010; Tirpanalan *et al.*, 2011).

2.4.2.2 Dióxido de cloro

O dióxido de cloro (ClO₂) atua como desinfetante através da disrupção da síntese proteica e da permeabilidade da célula bacteriana. É aceite como um desinfetante de utilização segura em vegetais desde 1998 e foi estabelecido que após a sua utilização os vegetais devem ser sujeitos a uma lavagem com água potável e o dióxido de cloro residual não deverá ultrapassar os 3 ppm (Tirpanalan *et al.*, 2011). O dióxido de cloro apresenta diversas vantagens relativamente à utilização de soluções de cloro. Entre elas destaca-se o facto de não ser afetado pelo pH, a sua reduzida reação com a matéria orgânica presente e o facto de não produzir cloraminas carcinogénicas. Para além disto, o dióxido de cloro apresenta um poder oxidativo 2,5 vezes superior ao cloro. A eficácia relativa do dióxido de cloro na desinfecção de alface encontra-se descrita na Tabela 13.

Tabela 13 – Eficácia relativa da utilização de dióxido de cloro na desinfecção de alfaces (Tirpanalan *et al.*, 2011).

Tipo de microrganismo	Concentração de ClO ₂ (ppm)	Tempo de aplicação (minutos)	Redução obtida (log ₁₀ ufc/g)	Referências
<i>Listeria monocytogenes</i>	5	10	1,1	Zang <i>et al.</i> , 2005
	3	10	0,4	Zang <i>et al.</i> , 2005
	3	5	0,4	Zang <i>et al.</i> , 2005
<i>E. coli</i> O157:H7	5	10	1,2	Singh <i>et al.</i> , 2002
	5	5	0,98	Singh <i>et al.</i> , 2002
	10	5	1,3	Singh <i>et al.</i> , 2002
	10	10	1,7	Singh <i>et al.</i> , 2002
	20	5	1,4	Singh <i>et al.</i> , 2002
	20	10	1,7	Singh <i>et al.</i> , 2002
Aeróbios totais	1,5 (gasoso)	5	2,5	Zang <i>et al.</i> , 2005

Como desvantagens da sua utilização realça-se o facto de poder ser explosivo em elevadas concentrações (Tirpanalan *et al.*, 2011). Relativamente à sua utilização em alface, foram reportadas reações adversas na qualidade sensorial no terceiro dia de armazenamento após tratamento com 1,4 mg/L de dióxido de cloro durante 10,5 min (Sy *et al.*, 2005).

2.4.2.3 Peróxido de hidrogénio

O peróxido de hidrogénio (H_2O_2) tem capacidade de criar agentes oxidantes citotóxicos, entre os quais radicais hidroxilo, responsáveis pela oxidação da membrana celular e posteriormente do DNA microbiano. Devido a este mecanismo o peróxido de hidrogénio possui atividade bactericida e esporicida. Tem sido maioritariamente utilizado na desinfecção de superfícies que contactam com alimentos, no entanto têm sido efetuados diversos estudos que comprovam a sua eficácia na redução de contagens microbianas em pepinos, melão e pimenta sem que seja alterada a sua qualidade sensorial (Beuchat, 1997; Beuchat *et al.*, 1998; Park & Beuchat, 1999; Tirpanalan *et al.*, 2011). Quando testado em alfaces, o peróxido de hidrogénio causou queimaduras nas folhas (Parish *et al.*, 2003), pelo que a sua utilização é desaconselhada. Ainda assim a sua eficácia na descontaminação de alfaces foi estudada por diversos autores (Tabela 14). A maior vantagem obtida consiste na sua degradação em água e oxigénio, sem produção de resíduos prejudiciais.

Tabela 14 – Eficácia relativa do peróxido de hidrogénio na desinfecção de alfaces (adaptado de Tirpanalan *et al.*, 2011).

Tipo de microrganismo	Concentração de H_2O_2 (ppm)	Tempo de aplicação (minutos)	Redução obtida (\log_{10} ufc/g)	Referências
<i>Listeria monocytogenes</i>	40 (aerossol)	10	2,5	Oh <i>et al.</i> , 2005
	40 (aerossol)	30	2,7	Oh <i>et al.</i> , 2005
	50	1	1,7	Hellstrom <i>et al.</i> , 2006
	80	5	4,6	Rodgers <i>et al.</i> , 2004
<i>E coli</i> O157:H7	40 (aerossol)	10	0,8	Oh <i>et al.</i> , 2005
	40 (aerossol)	30	2,2	Oh <i>et al.</i> , 2005
	80	5	4,3	Rodgers <i>et al.</i> , 2004
Salmonella Thyphimurium	40 (aerossol)	10	0,3	Oh <i>et al.</i> , 2005
	40 (aerossol)	30	3,3	Oh <i>et al.</i> , 2005
Aeróbios totais	80	5	~1	Vandekinderen <i>et al.</i> , 2009
	250	5	2,4	Vandekinderen <i>et al.</i> , 2009

2.4.2.4 Ozono

O ozono (O_3) é um dos agentes desinfetantes introduzido na indústria alimentar como alternativa ao cloro. Esta molécula triatómica de oxigénio tem elevado poder oxidativo e a inativação dos microrganismos resulta da oxidação da membrana celular através da sua reação direta como ozono molecular ou, através de radicais livres dele derivados (Jongen, 2005; Ölmez, 2010; Kim *et al.*, 2011). O ozono é decomposto em oxigénio sem formação de nenhum outro produto, no entanto, na presença de matéria orgânica formam-se aldeídos, cetonas e ácidos carboxílicos. Têm sido desenvolvidos diversos trabalhos de investigação para averiguar qual a eficácia dos diferentes métodos de aplicação de ozono (o ozono borbulhante,

ozonização com agitação de baixa e alta velocidade, ozono aquoso, ozonização combinada com ultrassons) na desinfecção de vegetais. De entre os diversos métodos, ozono borbulhante mostrou-se como o mais efetivo (Ölmez, 2010; Kim *et al.*, 2011). Ficou também comprovado que o ozono é mais efetivo na inativação de microrganismos a temperaturas mais baixas, uma vez que a sua solubilidade em água aumenta à medida que a temperatura baixa (Ölmez, 2010). A eficácia do ozono na desinfecção de alfaces encontra-se descrita na Tabela 15.

Tabela 15 – Eficácia relativa da aplicação de ozono na desinfecção de alfaces (adaptado de Tirpanalan *et al.*, 2011).

Tipo de microrganismo	Tipo de aplicação	Quantidade de O ₃	Tempo de aplicação (min.)	Tipo de produto	Redução obtida (log ₁₀ ufc/g)	Referências
Aeróbios totais	Água ozonada	5 ppm	10	Alface inteira	1,5	Koseki <i>et al.</i> , 2001
	Água ozonada em spray	3 ppm	5	Alface cortada	1,6	Rodgers <i>et al.</i> , 2004
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	Água Ozonada	1,5 ppm	2	Folhas de alface	1,2	Ölmez, 2010
	Ozono borbulhante	30 g/h	2	Folhas de alface	2,0	Ölmez, 2010
	Água Ozonada	5 ppm	5	Alface cortada	1,1	Yuk <i>et al.</i> , 2006
	Spray de Ozono	3 ppm	5	Alface inteira e cortada	Indetectável	Rodgers <i>et al.</i> , 2004
	Água Ozonada	9,7 ppm	10	Alface cortada	1,4	Singh <i>et al.</i> , 2002
	Água ozonada	16,5 ppm	10	Alface cortada	1,4	Singh <i>et al.</i> , 2002
	Ozono Gasoso	5,2 ppm	10	Alface cortada	1,1	Singh <i>et al.</i> , 2002
	Ozono Gasoso	5,2 ppm	15	Alface cortada	1,4	Singh <i>et al.</i> , 2002
	Ozono Gasoso	7,6 ppm	10	Alface cortada	1,1	Singh <i>et al.</i> , 2002
	Ozono gasoso	7,6 ppm	15	Alface cortada	1,8	Singh <i>et al.</i> , 2002
<i>Listeria monocytogenes</i>	Spray com água ozonada	3 ppm	5	Alface inteira e cortada	Indetectável	Rodgers <i>et al.</i> , 2004
Leveduras	Spray com água ozonada	3 ppm	5	Alface cortada	1,6	Rodgers <i>et al.</i> , 2004
Bolores	Spray com água ozonada	3 ppm	5	Alface cortada	2,4	Rodgers <i>et al.</i> , 2004

Parish *et al.* (2003) reportam no seu estudo a ocorrência de descoloração e de alterações no sabor do alimento após aplicação de ozono.

No entanto a maior desvantagem da sua utilização é a segurança dos manipuladores, uma vez que, uma exposição excessiva ao ozono pode acarretar consequências negativas para a sua saúde. Por este motivo é essencial a instalação de um sistema de ventilação adequado que evite a inalação de ozono pelos trabalhadores (Ölmez, 2010). Esta questão, deixa implícita a necessidade de um elevado investimento económico inicial para que seja possível a aplicação de ozono em segurança.

2.4.2.5 Ácidos orgânicos

Os ácidos orgânicos devem as suas propriedades antimicrobianas à redução de pH que causam a nível intracelular. Esta alteração leva à inibição da glicólise assim como à disrupção da permeabilidade e do sistema de transporte membranar (Jongen, 2005; Tirpanalan *et al.*, 2011). Os ácidos orgânicos (ácido cítrico, ácido láctico e ácido acético) são ácidos fracos que penetram através da membrana plasmática devido às suas propriedades lipofílicas (Akbas & Ölmez, 2007; Rosa *et al.*, 2009). A sua utilização em alimentos é reconhecida como GRAS (*Generally Recognized as Safe*) embora a sua eficácia dependa do tipo de alimento em questão e varie de ácido orgânico para ácido orgânico. Há diversos estudos sobre a sua eficácia na desinfecção de alface (Tabela 16), entre eles o de Allende & Artes (2003) que sugerem que a desinfecção com ácido cítrico e ácido láctico a 0,5%, durante 2 minutos pode ser tão efetiva como o tratamento com cloro. No entanto, estudos desenvolvidos paralelamente sugerem que a redução microbiana obtida pode dentro da mesma espécie bacteriana, diferir de acordo com a tolerância de cada estirpe à redução do pH causada pelo ácido (Yuk *et al.*, 2006).

A eficácia do ácido acético como desinfetante tem sido estudada por diversos autores, de entre os quais, Akbas & Ölmez (2007), Bell *et al.* (1997) e Ölmez & Kretzchmar (2009). O ácido acético apresenta potencial como desinfetante de vegetais por se tratar de uma opção económica, intrincada nos hábitos de desinfecção da população e por existirem resultados comprovativos da sua eficácia na eliminação de *E. coli* O157:H7 e *L. monocytogenes* (Tabela 16), *Salmonella* Typhimurium (Bell *et al.*, 1997), *Yersinia enterocolitica* (Karapinar & Gönü, 1992) e *Shigella sonnei* (Wu *et al.*, 2000). De acordo com os dados da Tabela 16 o ácido acético apresenta maior eficácia na eliminação de *E. coli* que na eliminação de *L. monocytogenes*. A resistência da *L. monocytogenes* à desinfecção com ácido acético pode resultar de propriedades inerentes à natureza do próprio microrganismo, à sua capacidade de adesão às folhas de alface mas, para além disso, esta diferença pode advir da maior resistência das bactérias Gram-positivas a pH baixo e logo da sua maior resistência à ação desinfetante do ácido acético (Akbas & Ölmez, 2007).

Tabela 16 – Eficácia relativa da aplicação de ácidos orgânicos na desinfecção de alfaces (adaptado de Tirpanalan *et al.*, 2011).

Tipo de microrganismo	Tipo de aplicação	Quantidade (%)	Tempo de aplicação (min.)	Tipo de produto	Redução obtida (log ₁₀ ufc/g)	Referências
<i>E. coli</i> O157:H7	Ácido láctico	0,5	2	Folhas de alface	2,7	Allende & Artes, 2003
	Ácido láctico	1	2	Folhas de alface	2,9	Allende & Artes, 2003
	Ácido láctico			Alface cortada	1,1	Yuk <i>et al.</i> , 2006
	Ácido cítrico	1	5	Folhas de alface	2,9	Allende & Artes, 2003
	Ácido cítrico	0,5	5	Folhas de alface	2	Allende & Artes, 2003
	Ácido cítrico	1	5	Folhas de alface	3,1	Allende & Artes, 2003
	Ácido cítrico			Alface cortada	0,8	Yuk <i>et al.</i> , 2006
	Ácido acético			Alface cortada	0,2	Yuk <i>et al.</i> , 2006
	Ácido acético		5	Folhas de alface	3	Chang & Fang, 2007
	Ácido acético	0,5	2	Alface cortada	1,3	Akbas & Ölmez, 2007
	Ácido acético	0,5	5	Alface cortada	1,5	Akbas & Ölmez, 2007
	Ácido acético	1	2	Alface cortada	1,5	Akbas & Ölmez, 2007
	Ácido acético	1	5	Alface cortada	1,7	Akbas & Ölmez, 2007
	Ácido láctico	0,5	2	Folhas de alface	2	Allende & Artes, 2003
<i>Listeria monocytogenes</i>	Ácido láctico	1	2	Folhas de alface	2,1	Allende & Artes, 2003
	Ácido láctico		1	Alface cortada	0,93	Yuk <i>et al.</i> , 2006
	Ácido láctico		10	Alface cortada	~ 0,5	Zang <i>et al.</i> , 1996
	Ácido acético		10	Alface cortada	~ 0,2	Zang <i>et al.</i> , 1996
	Ácido acético		1	Alface cortada	0,6	Yuk <i>et al.</i> , 2006
	Ácido acético	0,5	2	Alface cortada	0,8	Akbas & Ölmez, 2007
	Ácido acético	1	2	Alface cortada	0,9	Akbas & Ölmez, 2007
	Ácido cítrico	0,5	2	Folhas de alface	1,4	Allende & Artes, 2003
	Ácido cítrico	1	2	Folhas de alface	1,6	Allende & Artes, 2003
	Ácido cítrico		1	Alface cortada	1,0	Yuk <i>et al.</i> , 2006

Alguns dos referidos autores reportaram também que o ácido acético pode ter impacto nas qualidades sensoriais da alface, uma vez que detetaram alterações no odor e sabor em alfaces assim desinfetadas (Wu *et al.*, 2000; Chang & Fang, 2007; Ölmez & Kretzchmar, 2009).

2.4.2.6 Extratos de plantas

Recentemente foi estudada, como potencial alternativa aos desinfetantes apresentados, a eficácia de doze extratos de diferentes plantas (Kim *et al.*, 2011). Os resultados obtidos encontram-se apresentados na Tabela 17; no estudo é também indicado que as qualidades sensoriais da alface não foram significativamente alteradas pela aplicação dos extratos (Kim *et al.*, 2011). Para além disso a utilização combinada destes extratos com os desinfetantes referidos mostrou potenciar a sua ação, podendo assim este sinergismo ser utilizado para maximização da sua eficiência (Rosa *et al.*, 2009).

Tabela 17 – Eficácia relativa de extratos de plantas na desinfecção de alface (adaptado de Tirpanalan *et al.*, 2011).

Tipo de microrganismo	Tipo de aplicação	Quantidade (%)	Tempo de aplicação (min.)	Tipo de produto	Redução obtida (log ₁₀ ufc/g)	Referências
<i>E. coli</i> O157:H7	Extracto de <i>Syzygium aromaticum</i>	0,5	10	Alface	> 2	Kim <i>et al.</i> , 2011
	Extracto de <i>Syzygium aromaticum</i>	10	3	Alface	>3	Kim <i>et al.</i> , 2011
	Óleo essencial de Thyme	0,1		Alface cortada	1,91	
		1		Alface cortada	2,33	
<i>Salmonella</i> Typhimurium	Extracto de <i>Syzygium aromaticum</i>	0,5	10	Alface	> 2	Kim <i>et al.</i> , 2011
	Extracto de <i>Syzygium aromaticum</i>	0,5	3	Alface	>3	Kim <i>et al.</i> , 2011

Têm sido atualmente propostas novas formas de aplicação dos desinfetantes numa tentativa constante de otimizar a redução microbiana (Sapers, 2001). Assim, tem sido proposta a desinfecção de vegetais através da infiltração com cloro ou peróxido de hidrogénio após embalagem a vácuo e tratamentos com vapor (Sapers, 2001) em alternativa à utilização de líquidos. O objectivo primordial seria facilitar o contacto entre o desinfetante e a superfície do vegetal. O tratamento com vapores de peróxido de hidrogénio tem sido investigado mas implica muito tempo e pode danificar alguns vegetais. Tem a grande vantagem de não produzir resíduos (Sapers, 2001). Também tem sido proposta a utilização de tecnologias de descontaminação combinadas, de acordo com o princípio “Hurdle Technology”, onde duas ou mais técnicas são utilizadas para prevenir o crescimento de microrganismos em vegetais (Parish *et al.*, 2003)

2.4.3 Desinfetantes físicos

A eficácia dos desinfetantes físicos em vegetais, tem estado sob estudo, uma vez que, a água eletrolisada ou a irradiação, são tecnologias que implicam custos elevados mas que apresentam índices de eficácia muito superiores à maioria dos desinfetantes químicos.

2.4.3.1 Água eletrolisada

A água eletrolisada (EW) é considerada um potencial desinfetante a utilizar em alternativa ao cloro (Issa-Zacharia *et al.*, 2010; Tirpanalan *et al.*, 2011). Através da eletrólise de uma solução de cloreto de sódio (NaCl) é produzida uma solução ácida contendo ácido hipocloroso (pH 2 - 3) no ânodo e uma solução alcalina contendo hidróxido de sódio no cátodo (pH 11 - 13).

A eficácia relativa da utilização de água eletrolisada na desinfecção de alfaces encontra-se descrita na Tabela 18.

Tabela 18 – Eficácia relativa de tratamentos com água eletrolisada na desinfecção de alface (adaptado de Tirpanalan *et al.*, 2011).

Tipo de microrganismo	Tipo de aplicação	Quantidade Cloro livre (ppm)	Tempo de aplicação (min.)	Tipo de produto	Redução obtida (\log_{10} ufc/g)	Referências
<i>E. coli</i> O157:H7	AEW pH 2,6	37,5 ± 2,5	1	Alface cortada	3,5	Park <i>et al.</i> , 2008
	AEW pH 2,6	50	2	Alface cortada	0,7	Tirpanalan <i>et al.</i> , 2011
	AEW pH 2,6	50	20	Alface cortada	1,0	Tirpanalan <i>et al.</i> , 2011
	AEW pH 2,5	45	1	Alface inteira	2,4	Park <i>et al.</i> , 1999
<i>L. monocytogenes</i>	NEW pH 8,6	48±4		Alface cortada	~1,2	Abadias <i>et al.</i> , 2008
	AEW pH 2,6	37,5 ± 2,5	1	Alface cortada	3,4	Park <i>et al.</i> , 2008
	AEW pH 2,5	45	1	Alface inteira	2,6	Park <i>et al.</i> , 1999
<i>S. Typhimurium</i>	AEW pH 2,6	37,5 ± 2,5	1	Alface cortada	3,4	Park <i>et al.</i> , 2008
<i>S. entérica</i>	NEW pH 8,6	48±4	3	Alface cortada	~1,4	Abadias <i>et al.</i> , 2008
Aeróbios totais	AEW pH 2,6	30	10	Alface inteira	~2,3	Koseki <i>et al.</i> , 2001
	NEW pH 8,6	52±6	3	Alface cortada	0,8	Abadias <i>et al.</i> , 2008
Leveduras e bolores	AEW pH 2,6	30	10	Alface inteira	~1,5	Koseki <i>et al.</i> , 2001
Coliformes	AEW pH 2,6	30	10	Alface inteira	~2,0	Koseki <i>et al.</i> , 2001
<i>Erwinia carotovora</i>	NEW pH 8,6	48±4	3	Alface cortada	~1,2	Abadias <i>et al.</i> , 2008

As soluções ácidas contêm entre 20 a 60 ppm de cloro livre, possuindo por esse motivo um elevado poder bactericida (Tirpanalan *et al.*, 2011; Park & Beuchat, 1999). A água eletrolisada ácida (AEW) apresenta a vantagem de combinar concentrações altas de cloro livre (e por isso elevado poder de oxidação) e pH baixo (que maximiza o efeito do cloro livre), no entanto, foram reportadas alterações de cor e algumas queimaduras nas folhas de alface desinfetadas com AEW (Tirpanalan *et al.*, 2011). Por este motivo foi desenvolvida a água eletrolisada neutra (NEW) (pH 8,0±0,5) que com 50 ppm de cloro livre obteve eficácias similares a lavagens com cloro livre [120 ppm] contra *Salmonella* e *E. coli* O157:H7 (Tirpanalan *et al.*, 2011). A eficácia relativa dos dois tipos de água eletrolisada na desinfecção de alface encontra-se descrita na Tabela 18.

2.4.3.2 Irradiação

A irradiação apresenta-se como mais uma forma para desinfeção de vegetais, efetiva contra bactérias patogénicas e parasitas, uma vez que, as células vegetativas das bactérias patogénicas e a maioria dos parasitas são extremamente sensíveis à radiação (Tirpanalan *et al.*, 2011). A irradiação consiste na exposição de alimentos a radiação ionizante que gera radicais livres a partir da água por radiólise. As moléculas de água perdem um eletrão e produzem radicais hidroxilo e peróxido de hidrogénio (H₂O₂) que interferem com a ligação dos ácidos nucleicos e causam danos a nível do DNA (Tirpanalan *et al.*, 2011). A eficácia relativa da irradiação em alfaces encontra-se na Tabela 19.

Tabela 19 – Eficácia relativa da irradiação com raio x e γ na desinfeção de alface (adaptado de Tirpanalan *et al.*, 2011).

Tipo de microrganismo	Tipo de irradiação	Dose aplicada (kGy)	Redução obtida (log ₁₀ ufc/g)	Referências
<i>E. coli</i> O157:H7	Raio-X	0,1	1,3	Mahmound, 2010
	Raio-X	1	4,4	Mahmound, 2010
	Raio Gamma	0,5	~2,3	Niemira, 2008
	Raio Gamma	1	~4	Niemira, 2008
	Raio Gamma	0,53	5,4	Foley <i>et al.</i> , 2002
	Raio Gamma	200	5,4	Foley <i>et al.</i> , 2002
<i>Listeria monocytogenes</i>	Raio-X	0,1	1,6	Mahmound, 2010
	Raio-X	1	4,1	Mahmound, 2010
<i>Salmonella</i> (Enteritidis, Montevideo)	Raio-X	0,1	1,0	Mahmound, 2010
	Raio-X	1	4,8	Mahmound, 2010
Aeróbios totais	Raio Gamma	0,5	~3,3	Hagenmaier <i>et al.</i> , 1997
	Raio Gamma	1	2,4	Zhang & Farber, 2006
Leveduras	Raio Gamma	0,5	~1,9	Hagenmaier <i>et al.</i> , 1997
<i>Shigella flexneri</i>	Raio-X	0,1	1,3	Mahmound, 2010

Para a desinfeção de vegetais é sugerida uma dose de irradiação baixa, na ordem dos 0,25 – 1,0 kGy (EFSA defende 1,0 kGy como o valor máximo tolerável para utilização em vegetais, uma vez que valores superiores a 0,5 kGy induzem deterioração das suas qualidades sensoriais) (Tirpanalan *et al.*, 2011). No entanto este limite máximo, de 1 kGy, pode não ser suficiente para assegurar uma redução da carga microbiana em alfaces uma vez que, a aplicação de 1 kGy na sua superfície, significa que a parte mais interior da alface só recebe 0,2 kGy (Tirpanalan *et al.*, 2011).

Este tipo de desinfeção exige um elevado investimento e torna-se inexequível em vegetais como a alface.

2.4.3.3 Radiação UV

A radiação UV causa despolarização membranar e altera o fluxo normal de iões levando à formação dos denominados dímeros de pirimidinas na cadeia de DNA. Devido às subsequentes mutações no DNA, ao bloqueio da transcrição e replicação, a célula acabará por morrer (Allende & Artes, 2003; Tirpanalan *et al.*, 2011). A nível europeu, o tratamento com radiação UV é considerada tecnologia de irradiação. Nos Estados Unidos o tratamento de sumos de fruta com UV foi aprovado em alternativa à usual pasteurização (Tirpanalan *et al.*, 2011). Este tipo de tratamento levanta muita discussão e não é ainda aceite de forma consensual. A sua maior vantagem é o baixo custo a que está associado, a inexistência de resíduos e a brevidade do tempo de exposição que tem sido proposto. No entanto, a pouca informação científica sobre a sua eficácia na redução da carga microbiana continua a ser a maior desvantagem a apontar para a sua utilização (Yaun *et al.*, 2004; Tirpanalan *et al.*, 2011). Os resultados obtidos na desinfecção de alfaces com UV encontram-se na Tabela 20.

Tabela 20 – Eficácia relativa do tratamento com UV (254nm) na desinfecção de alface (adaptado de Tirpanalan *et al.*, 2011).

Microrganismo	Dose aplicada (kJ/m ²)	Tipo de produto	Redução (Log ₁₀ ufc/g)	Referencias
Bactérias psicotróficas	8,14	Alface inteira	~1,0	Allende & Artes, 2003
Coliformes	8,14	Alface inteira	~0,6	Allende & Artes, 2003
<i>Enterobacteriaceae</i>	1,18	Alface cortada	~0,5	Allende & Artes, 2003
Leveduras	8,14	Alface inteira	~0,8	Allende & Artes, 2003

3 DESENVOLVIMENTO DE UM SISTEMA DE SEGURANÇA PARA AS ALFACES NAS CANTINAS DA UTL

3.1 Requisitos gerais

A segurança sanitária dos alimentos é uma área que vem assumindo cada vez mais relevância social, económica e política. Está relacionada com a presença de perigos associados aos géneros alimentícios no momento do seu consumo. Como a introdução desses perigos pode ocorrer em qualquer etapa da cadeia alimentar, torna-se essencial a existência de um controlo adequado ao longo de toda a cadeia de produção. Consequentemente, a segurança sanitária dos alimentos é resultado de vários fatores: a legislação deve determinar os requisitos mínimos de higiene, deverão ser instaurados controlos oficiais para verificar a sua observância e os operadores de empresas do setor alimentar deverão ainda criar e aplicar programas de segurança dos alimentos e processos baseados nos princípios da Análise de Perigos e Pontos de Controlo Críticos (HACCP) conforme disposto no Regulamento (CE) n.º 178/2002.

O sistema HACCP é um processo sistemático e cientificamente fundamentado, pensado para incorporar os processos de produção, transformação e comercialização de alimentos, os elementos essenciais para a garantia da sua segurança. Este sistema tal como proposto pelo Comité do *Codex Alimentarius* (CAC, 1997) é essencial para assegurar aos consumidores e às autoridades sanitárias os níveis de segurança sanitária dos alimentos considerados aceitáveis. Baseia-se na prevenção e no controlo dos perigos considerados relevantes para cada processo concreto.

A elaboração de um sistema HACCP requer uma análise dos perigos exaustiva e sistemática e a identificação dos pontos de controlo críticos (PCC), bem como a definição das medidas de controlo dos perigos existentes no processo particular dessa empresa. Um plano devidamente implementado permite fazer prova da diligência, uma vez que os registos da monitorização, das ações corretivas, das verificações e das auditorias podem ser exibidas como prova em tribunal (van Schothorst & Kleiss, 1994).

O documento de orientação para o desenvolvimento de planos de HACCP refere explicitamente que antes de se implementar um plano HACCP, já devem estar implementados os pré-requisitos e códigos de boas práticas de higiene, necessários para garantir a segurança do produto (CAC, 1997).

3.2 Pré-requisitos do sistema de segurança dos alimentos

A introdução da metodologia HACCP incidu sobre os aspetos de gestão do risco sem preocupação quanto ao sistema funcional de suporte que seria necessário para a sua implementação. Este sistema de suporte é garantido pelo designado, programa de pré-requisitos (PPR), e é definido como as atividades e condições básicas necessárias para manter um ambiente higiénico ao longo da cadeia alimentar, apropriado à produção, ao manuseamento e ao fornecimento de géneros alimentícios seguros para o consumo humano (ISO 22000, 2005). O PPR, nas empresas do sector alimentar, é por este motivo, considerado indispensável ao funcionamento e implementação de sistemas HACCP. Deste modo, deve ser estabelecido, implementado e mantido um PPR que ajude a controlar:

- a probabilidade de introdução de perigos para a segurança dos alimentos no produto através do ambiente de trabalho;
- a contaminação biológica, química ou física dos produtos incluindo a contaminação cruzada entre produtos;
- os níveis de perigo para a segurança dos alimentos e no ambiente de processamento. O PPR deverá ser aprovado pela equipa de segurança sanitária dos alimentos e deverá ser apropriado às necessidades organizacionais, à dimensão, ao tipo de operação e à natureza dos produtos que são produzidos ou manuseados. Este deverá ser implementado ao longo de todo o sistema de produção quer com programas de aplicação geral ou programas aplicáveis a um produto particular ou a uma linha de operação (ISO 22000, 2005).

Ao estabelecer o PPR, a organização deve ter em consideração os requisitos estatutários e regulamentares (Regulamento (CE) n.º 852/2004), os requisitos dos clientes, as linhas de orientação reconhecidas, os princípios e os códigos de boas práticas da Comissão de *Codex Alimentarius*. O PPR deverá ser claro, exequível e deverá incluir indicações relativas (ISO 22000, 2005):

- a) à construção e disposição dos edifícios e infraestruturas associadas;
- b) à disposição dos locais, incluindo ambiente de trabalho e instalações para os trabalhadores;
- c) ao fornecimento de, água, energia e outros serviços;
- d) aos serviços de apoio incluindo a eliminação dos resíduos e do lixo;
- e) à adequação do equipamento, sua acessibilidade para limpeza, manutenção e manutenção preventiva;
- f) à gestão dos produtos adquiridos (ex. matérias-primas, ingredientes, substâncias químicas e materiais de embalagem), fornecimentos (ex. água), e manuseamento dos produtos (ex.

- armazenamento e transporte);
- g) às medidas de prevenção da contaminação cruzada;
- h) à limpeza e desinfecção;
- i) ao controlo de pragas;
- j) à higiene pessoal.

Os PPR são usualmente os mesmos ao longo de toda a cadeia alimentar, não obstante, a segurança microbiológica dos vegetais passa, obrigatoriamente, por um cuidado especial em relação às condições higio-sanitárias do pessoal, utensílios e equipamentos envolvidos e da estrutura da instalação do estabelecimento de restauração coletiva. Assim sendo, embora não existam PPR específicos para vegetais, questões como a limpeza e desinfecção dos tanques de lavagem e de desinfecção, das tábuas e utensílios de corte, a higiene dos manipuladores e a qualidade da água utilizada no processamento de vegetais, deverão estar cobertas pelos programas gerais implementados.

A implementação do PPR deverá ter em conta as especificidades de cada estabelecimento de forma a garantir um ambiente higiénico apropriado à produção de alimentos seguros para o consumo humano.

3.3 Etapas preliminares à análise de perigos

3.3.1 Equipa de segurança alimentar

A primeira tarefa na aplicação do sistema HACCP é criar uma equipa que tenha o conhecimento e experiência necessários para desenvolver um plano HACCP. A equipa em questão deve ser multidisciplinar, combinando os conhecimentos e experiência que lhes permitam avaliar e identificar os perigos e pontos críticos de controlo. Nos estabelecimentos de menor dimensão, uma só pessoa poderá desempenhar vários papéis ou mesmo constituir toda a equipa. Neste último caso, o uso de consultores externos ou aconselhamento poderá ser ocasionalmente necessária, podendo ser solicitados peritos externos independentes para aconselhar sobre questões identificadas como problemáticas (CDC, 2004).

O pessoal selecionado para constituir a equipa deve ter noções básicas das tecnologias e equipamentos utilizados, conhecer o fluxo e a tecnologia de produção. Os membros da equipa deverão também conhecer os princípios gerais do *Codex* de Higiene Alimentar e as orientações para a aplicação do sistema HACCP (CDC, 2004). Este tipo de formação

garantirá que a equipa trabalha com um foco comum e utilizando o mesmo tipo de abordagem e de terminologia.

3.3.2 Descrição do produto alimentar

A enumeração das características relevantes do produto alimentar (Tabela 21) torna-se essencial pois permite-nos equacionar a existência de características do produto que sejam potenciadoras de perigos para a segurança dos alimentos.

Tabela 21 – Descrição do produto – alface (adaptado de Ohse *et al.*, 2001)

Nome do Produto	<i>Lactuca sativa</i>
Estrutura morfológica	- Folha, caule e rebento
Características do produto	- Vegetal folhoso - Folhas largas de forma arredondada - Textura rugosa
Caraterísticas importantes da sua produção	- Humidade ótima de crescimento: 65 – 85%. - Temperatura ótima de crescimento: 15 – 18°C. - Primeira fase de crescimento: solos quentes e arenosos. - Última fase de crescimento: solo barroso ou turfa. - É essencial boa drenagem e alto teor de matéria orgânica.
Utilização esperada	Consumo a cru após corte e lavagem.
Tempo de vida	O tempo de vida do produto está dependente da contaminação inicial, condições de transporte, armazenamento, tipo de desinfetante utilizado e momento de corte.
Local de venda do produto	Estabelecimentos de restauração, grandes superfícies de distribuição, mercados e pequeno comércio.
Cuidados no transporte	Em refrigeração (<5°C)
Pragas comuns	- Insetos: <i>Trichoplusia ni</i> ; <i>Acyrtosiphon pisum</i> ; <i>Agriotes mancus</i> . - Fungos: <i>Botrytis cinerea</i> ; <i>Claviceps purpurea</i> ; <i>Phythium</i> spp., <i>Pseudoperonospora humuli</i> , <i>Rhizoctonia solani</i> . - Micoplasma: <i>Aster yellows phytoplasma</i>

A alface (*Lactuca sativa*) é uma planta anual nativa da região do mediterrâneo cujo cultivo parece ocorrer desde 4500 A.C. Em Portugal é cultivada para aproveitamento das suas folhas, utilizadas maioritariamente na confeção de saladas entre outros preparados culinários.

O pH da alface (5,5 – 6,0), a sua elevada percentagem de água (96,1 %) (Tabela 22), a grande superfície de exposição das suas folhas (solo e águas de rega) e a frequência com que se partem ou sofrem roturas criam condições que podem favorecer o crescimento microbiano (Tirpanalan *et al.*, 2011).

Tabela 22 – Composição química da alface crua (Ohse *et al.*, 2001).

Composição da Alface Crua (100g)											
Água (%)	Proteína	Hidratos de Carbono	Fibra Alimentar	Lípidos	Cálcio	Fósforo	Ferro	Potássio	Sódio	Tiamina	Riboflavina
96,1%	1,3g	1,7g	1,8g	0,2g	38mg	26mg	0,4mg	267mg	3mg	0,11mg	0,12mg

Todos os elementos implicados na cultura de alfaces influenciam a sua qualidade e segurança para o consumidor tais como os fertilizantes, os pesticidas, os esgotos, as lamas, os contaminantes atmosféricos no material das plantas colhidas, ou os metais pesados (Pinto, 2007).

A este propósito, a alface é considerada uma das espécies mais eficientes na sua absorção e acumulação (zinco, cobre, chumbo, cádmio e níquel), sobretudo nas folhas. Por exemplo: a localização dos campos de produção próximo de vias públicas com tráfego automóvel intenso ou próximo de grandes centros urbanos mais poluídos pode influenciar negativamente as alfaces aí cultivadas (Pinto, 2007).

3.3.3 Utilização esperada

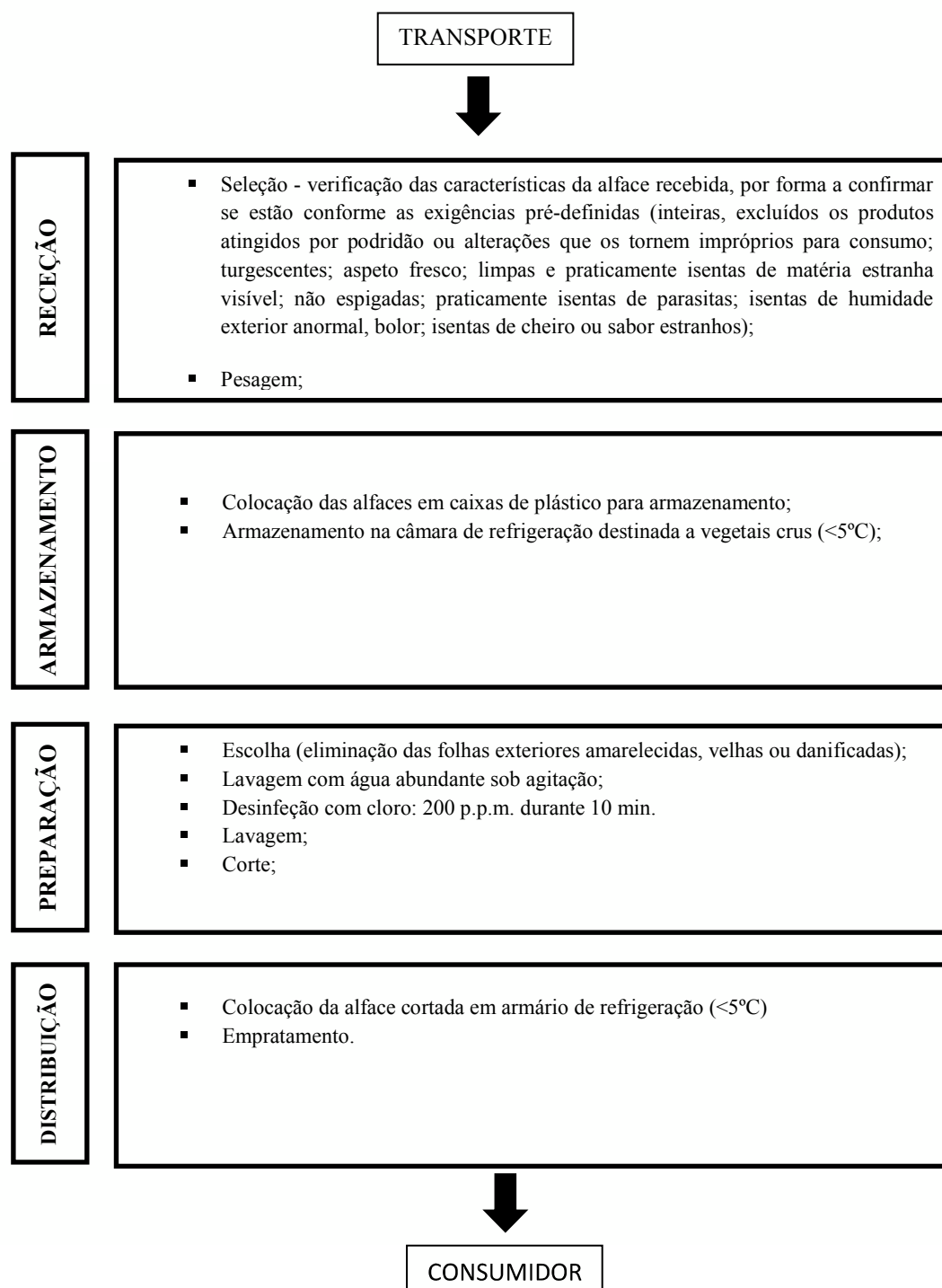
Através da análise da utilização esperada, pretende-se identificar quem consome geralmente o produto, a fim de caracterizar os grupos de risco da população que podem ser atingidos por perigos, eventualmente nele veiculados.

A apetência dos consumidores pelo consumo de saladas e vegetais crus tem vindo a aumentar em Portugal, a par do que sucede nos restantes países da Europa (Das *et al.*, 2011). Dentro dos vegetais para consumo em cru, a alface é o hortícola mais cultivado e a planta mais apreciada para preparação de saladas, sendo a mais consumida em todo o mundo (Pinto, 2007). Nas cantinas universitárias, a alface destina-se a ser consumida crua por uma população jovem, informada e saudável. Existe, no entanto, um grupo mais restrito de consumidores de entre os quais se destacam grávidas e trabalhadores das cantinas com mais idade.

3.3.4 Descrição do processo

Nas cantinas universitárias a alface é entregue após transporte e a sua receção é efetuada no cais de receção, onde primeiramente é verificado se as alfaces estão de acordo com o contratualizado, confirma-se o tipo de alface, qualidade da mesma e o peso do produto (Figura 5).

Figura 5 – Processo de preparação das alfaces destinadas a serem consumidas cruas.



Para o seu correto armazenamento as alfaces são colocadas em caixas de plástico, material que permite a higienização regular, com orifícios largos que permitem a circulação de ar e são então colocados na câmara de refrigeração para vegetais crus ($< 5^{\circ}\text{C}$). À data do seu consumo, a alface é retirada da câmara de refrigeração e dar-se-á início à sua preparação. Após a retirada das alfaces da câmara de refrigeração as alfaces são preparadas numa sala à temperatura ambiente. Nesta etapa as folhas externas que se encontrem estragadas são eliminadas. As folhas são lavadas com água abundante (algumas cantinas apresentam tanques com circulação de água, o que facilita o processo de lavagem). Após a lavagem, é eliminada a água e seguir-se-á a desinfecção com adição de cloro consoante as indicações dos fabricantes (JohnsonDiversey® 1 pastilha por cada 10 L de água, durante 10 minutos para atingir 200 ppm de cloro ativo). Após a desinfecção a água com cloro é eliminada e a alface é cortada, sendo posteriormente colocada em tabuleiros inox e conservada em ambiente refrigerado ($< 5^{\circ}\text{C}$) até ao consumo.

3.4 Análise de perigos

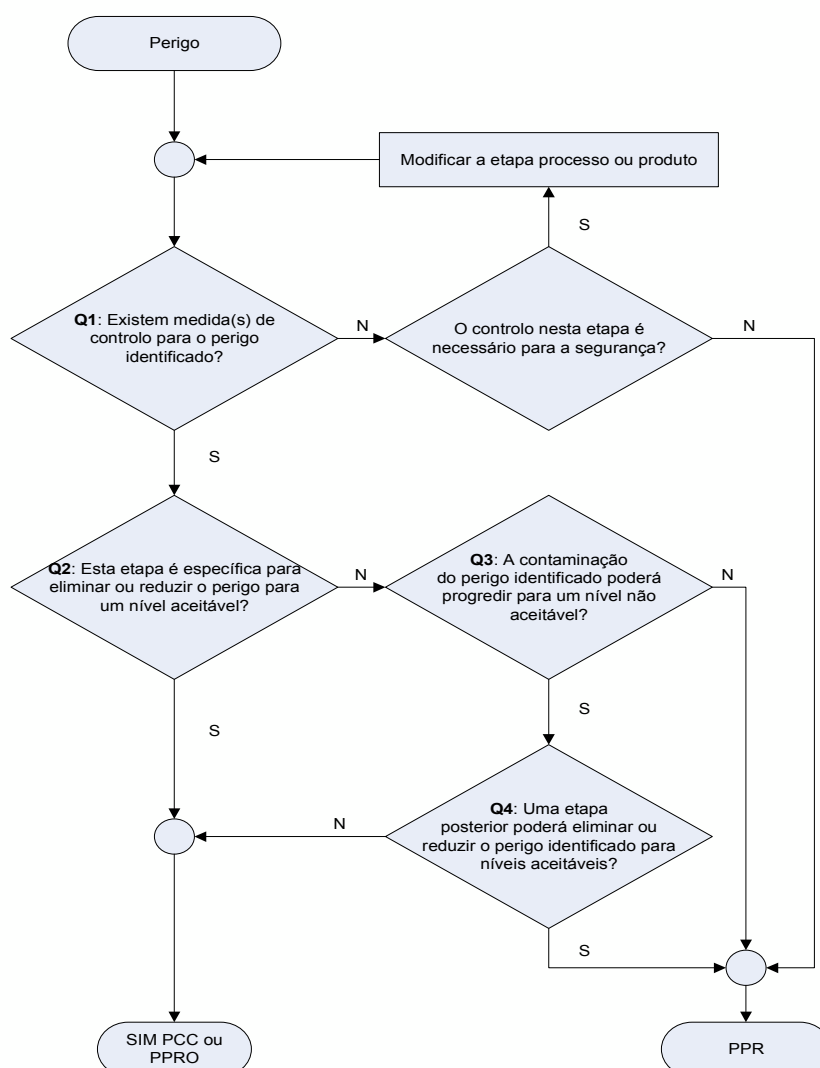
Todos os perigos de natureza biológica, química ou física para a segurança dos alimentos, razoavelmente expectáveis em relação ao tipo de produto, de processo e de instalações utilizadas, devem ser identificados, registados e avaliados. A identificação de perigos deve ser baseada na informação preliminar e nos dados recolhidos nas etapas preliminares à análise de perigos (ponto 2.3), na experiência e na informação da cadeia alimentar (dados epidemiológicos, dados históricos), considerando as etapas anteriores e posteriores à operação especificada, o equipamento do processo, infra-estruturas e zonas circundantes e as ligações a montante e a jusante na cadeia alimentar (ISO 22000, 2005). Cada perigo para a segurança dos alimentos deve ser avaliado de acordo com a possível severidade dos seus efeitos adversos sobre a saúde e a probabilidade da sua ocorrência. Segue-se um exemplo de uma metodologia possível para a avaliação dos perigos (WHO/FAO, 1998).

Tabela 23 – Determinação da significância do perigo (WHO/FAO, 1998).

PROBABILIDADE	Alta	Satisfatório	Menor	Maior	Crítico
	Média	Satisfatório	Menor	Maior	Maior
	Baixa	Satisfatório	Menor	Menor	Menor
	Negligenciável	Satisfatório	Satisfatório	Satisfatório	Satisfatório
		Negligenciável	Baixa	Média	Alta
SEVERIDADE					

Se a avaliação do perigo é considerada satisfatória significa que não é relevante ou pode ser controlado através de programa de pré-requisitos. Se a avaliação do perigo é considerada menor, maior ou crítica seguem-se as perguntas da árvore de decisão (Figura 6).

Figura 6 – Perguntas da árvore de decisão para a determinação dos PCC (WHO/FAO, 2001).



3.4.1 Perigos físicos

Podem aparecer no produto final (salada de alface) diversos corpos estranhos introduzidos na exploração primária (Tabela 24) ou ao longo de todos os processos que ocorrem no estabelecimento de restauração coletiva (Tabela 24). A generalidade deste tipo de perigos pode ser controlada se forem adotadas medidas de controlo como BPA na exploração primária, manutenção dos equipamentos, boas práticas de higiene pessoal (incluindo a não utilização de adornos) e lavagens cuidadas de cada folha de alface.

Tabela 24 – Identificação de perigos físicos.

Etapas e descrição dos perigos físicos identificados	P	S	SP	Medidas de controlo
PRODUÇÃO PRIMÁRIA Corpos estranhos (aparas de madeira, metais, etc.)	N	B	S	Seleção de fornecedores. Protocolos de lavagem de vegetais.
RECEÇÃO Corpos estranhos provenientes dos manipuladores (adereços: brincos, anéis, pulseiras).	N	B	S	BPH Programa de lavagem e desinfeção de vegetais
ARMAZENAMENTO Não foram identificados perigos físicos.	-	-	-	-
PREPARAÇÃO Objetos provenientes dos equipamentos de lavagem e de corte.	N	B	S	Manutenção dos equipamentos
Objetos provenientes dos próprios manipuladores (adereços: brincos, anéis, pulseiras).	B	B	Me	BPH
DISTRIBUIÇÃO Objetos provenientes dos equipamentos de frio.	N	B	S	Manutenção dos equipamentos
Objetos provenientes dos próprios manipuladores (adereços: brincos, anéis, pulseiras).	B	B	Me	BPH

Legenda: P – probabilidade; S – severidade; N – negligenciável; B – baixa; M – média; A – alta;
SP – significância do perigo; S – satisfatória; Me – menor; Ma – maior; Cr – crítica.

Medida de controlo: ação ou atividade que pode ser utilizada para prevenir ou eliminar um perigo para a segurança dos alimentos ou reduzi-lo para um nível aceitável.

3.4.2 Perigos químicos

Há uma extensa lista de perigos químicos que podem estar presentes na alface para consumo crua, mas o risco associado ao consumo de cada um deles é muito variável, em função da sua frequência, das concentrações em que se encontra nos alimentos e também da severidade dos efeitos para a saúde humana. A União Europeia fixa teores máximos de certos contaminantes

(Regulamento (CE) N.º 1881/2006; Regulamento (CE) N.º 1882/2006; Regulamento (CE) N.º 322/2012) de maneira a reduzir a presença desses contaminantes nos géneros alimentícios a níveis tão baixos quanto razoavelmente possível segundo as boas práticas de fabrico ou agrícolas. O objetivo é obter um nível elevado de proteção da saúde pública, inclusive para os grupos mais sensíveis da população: crianças, idosos, grávidas, pessoas alérgicas.

O Regulamento (CE) N.º 322/2012 fixa os teores máximos de pesticidas, ao nível mais baixo que as boas práticas de fabrico ou as boas práticas agrícolas podem permitir (ALARA, *As Low As Reasonably Achievable*). Estes limites aplicam-se à parte edível dos géneros alimentícios, aplicando-se igualmente aos géneros alimentícios compostos ou transformados. O teor máximo de resíduos de pesticidas em alface foi fixado em 0,5 mg/kg. A Tabela 25 apresenta dados sobre resíduos de pesticidas encontrados em alfaces cruas, frequência de deteção e sua toxicidade.

Tabela 25 – Resíduos de pesticidas encontrados em alface (USDA-Pesticide data program, 2005).

PESTICIDA	FREQUÊNCIA COM QUE É DETECTADO	TOXICIDADE			
		Efeito Carcinogénico	Disruptor hormonal	Neurotoxina	Toxina reprodutiva e do crescimento
Dimethy Tetrachloroterephthalate	30,6%	×			
Permethrin cis	19,8%	×	×		
Permethrin trans	17,7%	×	×		
DDE p,p'	14,6%	×	×		×
Methomyl	13,3%		×	×	
Diazinon	13,1%	×	×		×
o-Phenylphenol	12,6%	×	×		×
Cyhalothrin-L + R157836 epimer	12,2%		×		
Cyhalothrin, Lambda	10,2%		×		
Dimethoate	10,1%	×	×	×	×
Endosulfan I	8,9%		×		
Omethoate	8,5%		×	×	
Acephate	8,1%		×	×	
Cypermethrin	7,3%		×		
Carbendazim (MBC)	6,5%	×	×		
Endosulfan II	6,2%		×		
Methamidophos	2,6%			×	
Chlorpyrifos	2,6%		×	×	
Boscalid	2,5%	×			
Trifluralin	2,3%	×	×		
Iprodione	1,9%	×	×		
Thiabendazole	1,3%	×			×
Dicloran	1,2%	×			
DDT o,p'	0,6%				×
Pronamide	0,5%	×	×		
Vinclozolin	0,5%	×	×		×
DDT p,p'	0,4%	×	×		×
Linuron	0,4%	×	×		×
Piperonyl butoxide	0,3%	×	×		
Fenbuconazole	0,2%	×	×		
Pymetrozine	0,2%	×			
Atrazine	0,2%	×	×		
Dicofol p,p'	0,2%	×	×		
Malathion	0,1%	×	×	×	

Os nitratos são outro exemplo de perigos químicos presentes nos produtos hortícolas. Devido às condições climáticas em determinados Estados-Membros é difícil garantir que os teores máximos para a alface não sejam ultrapassados. Nestas circunstâncias os Estados-Membros que os ultrapassem estão autorizados a colocar temporariamente à venda no seu território alfaces que apresentem teores em nitratos superiores aos fixados no Regulamento (CE) N.º 1881/2006 (Tabela 26), na condição de que os teores em questão sejam aceitáveis do ponto de vista da saúde pública. Este período transitório deverá ser suficiente para permitir aos Estados-Membros em causa tomarem as medidas necessárias para poderem respeitar as normas comunitárias o mais depressa possível. Visto que as condições climáticas têm uma grande influência nos níveis de nitratos em certos produtos hortícolas, tais como a alface, devem ser fixados diferentes teores máximos de nitratos consoante a estação do ano.

Tabela 26 – Teores máximos de nitratos de acordo com o Regulamento (CE) n.º 1881/2006.

Géneros Alimentícios	Teores máximos de Nitratos
Alface fresca (<i>Lactuca sativa</i> L.)	Colhida de 1 de Outubro a 31 de Março: - Alface cultivada em estufa - 4500 mg NO ₃ /Kg - Alface do campo* - 4000 mg NO ₃ /Kg
	Colhida de 1 de Abril a 30 de Setembro: - Alface cultivada em estufa – 3500 mg NO ₃ /Kg - Alface do campo* – 2500 mg NO ₃ /Kg

*Regulamento (CE) n.º 1881/2006 define as seguintes disposições específicas relativas à alface (Art.º 6.º): “A menos que a alface seja cultivada em estufa, seja rotulada como tal, são aplicáveis os teores máximos fixados no anexo para a alface do campo”.

Os Estados-Membros monitorizam os teores de nitratos presentes nos produtos hortícolas e comunicam anualmente até 30 de Junho, os resultados à Comissão Europeia (Regulamento (CE) n.º 1881/2006).

A alface é uma das espécies mais eficientes na absorção e acumulação nas suas folhas de metais pesados (chumbo, cádmio, zinco), pelo que o Regulamento (CE) n.º 1881/2006 fixa que a alface enquanto produto hortícola folhoso não pode apresentar concentrações superiores a 0,20 mg/kg de Cádmio e 0,30 mg/kg de Chumbo. Em relação ao zinco não se encontram regulamentados valores máximos em legislação, no entanto, Pinto (2007) refere que os teores normais de Zinco nas plantas são da ordem de 25-150 mg/kg, pelo que, a partir destes valores, não é aconselhável o consumo do produto pois pode acarretar danos na saúde humana.

A prevenção da introdução na cadeia alimentar de perigos químicos é feita maioritariamente

ao nível da produção primária (Tabela 27). Ao nível da restauração a prevenção de perigos químicos passa pela adoção de boas práticas de fabrico, através da utilização de protocolos de lavagem e desinfeção eficientes mas também pela seleção de fornecedores (Tabela 27). Os fornecedores selecionados deveriam ser certificados e deveriam disponibilizar informações como fichas técnicas e controlos analíticos referentes aos produtos, licença de exploração e certificado de conformidade com os limites fixados no Regulamento (CE) 1881/2006.

Tabela 27 – Identificação de perigos.

Etapas e descrição dos perigos químicos identificados	P	S	SP	Medida de controlo
EXPLORAÇÃO PRIMÁRIA				
Resíduos de pesticidas	B	N	S	Seleção de fornecedores. Protocolos de lavagem e desinfeção.
Nitratos	B	N	S	
Metais pesados	M	N	S	
RECEÇÃO				
Resíduos de detergente nos recipientes plásticos de armazenamento.	N	N	S	Programa de lavagem e desinfeção de vegetais
ARMAZENAMENTO				
Não foram identificados perigos químicos.	-	-	-	-
PREPARAÇÃO				
Contaminação através da introdução de detergentes na água de lavagem ou sobredosagem de desinfetante.	M	N	S	BPL Formação dos manipuladores Lavagem posterior à desinfeção
DISTRIBUIÇÃO				
Não foram identificados perigos químicos.	-	-	-	-

Legenda: P – probabilidade; S – severidade; N – negligenciável; B – baixa; M – média; A – alta;
SP – significância do perigo; S – satisfatória; Me – menor; Ma – maior; Cr – crítica.

3.4.3 Perigos biológicos

Os perigos biológicos estão geralmente associados a más práticas de higiene, manuseamento inadequado dos géneros alimentícios e contaminações cruzadas. Estes são considerados os perigos que apresentam o maior risco à inocuidade dos géneros alimentícios. Há inúmeros microrganismos que podem estar presentes nos vegetais de forma frequente, esporádica, ou que fazem parte da sua microbiota natural. Como perigos biológicos incluem-se não só bactérias, fungos, vírus e parasitas assim como as toxinas microbianas que estes possam produzir. Na Tabela 28 encontram-se assinaladas as bactérias isoladas em alfaces cruas e que, não sendo na sua maioria patogénicas afetam o tempo de vida dos vegetais, pois causam a sua

deterioração, alterações de sabor, odor e aspeto geral do produto. Foi efetuada a sua distinção entre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, uma vez que certas bactérias apresentam maior resistência ao cloro livre (desinfetante utilizado nas cantinas da UTL). As bactérias formadoras de esporos tais como *Bacillus* e *Clostridium* são muito resistentes à desinfeção com cloro, quando disseminadas na forma de esporo (WHO, 2004). Por seu lado, Norton & LeChevallier (2000) demonstram no seu estudo que a maioria das bactérias resistentes à desinfeção com cloro eram Gram-positivas.

Tabela 28 – Bactérias isoladas em alface crua.

Tipo		Espécie	Referência
Bactérias	Gram-positivas	<i>Bacillus</i> sp.	Magnuson <i>et al.</i> 1990
		<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>	Magnuson <i>et al.</i> 1990
		<i>Enterococci</i>	Soriano <i>et al.</i> 2001
		<i>Listeria monocytogenes</i>	Loncarevic <i>et al.</i> 2005
		<i>Staphylococcus aureus</i>	Soriano <i>et al.</i> 2001
	Gram-negativas	<i>Alcaligenes faecalis</i>	Magnuson <i>et al.</i> 1990
		<i>Citrobacter freundii</i>	Soriano <i>et al.</i> 2001
		<i>Chryseomonas luteola</i>	Soriano <i>et al.</i> 2001
		<i>Enterobacter agglomerans</i>	Magnuson <i>et al.</i> 1990
		<i>Enterobacter cloacae</i>	Soriano <i>et al.</i> 2001
		<i>Erwinia carotovora</i>	Magnuson <i>et al.</i> 1990
		<i>Erwinia herbicola</i>	Magnuson <i>et al.</i> 1990
		<i>Escherichia coli</i>	Soriano <i>et al.</i> 2001
		<i>Flavobacterium breve</i>	Magnuson <i>et al.</i> 1990
		<i>Janthinobacterium lividum</i>	Magnuson <i>et al.</i> 1990
		<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Soriano <i>et al.</i> 2001
		<i>Klebsiella oxytoca</i>	Soriano <i>et al.</i> 2001
		<i>Klebsiella ozaenae</i>	Soriano <i>et al.</i> 2001
		<i>Moraxella</i> spp.	Soriano <i>et al.</i> 2001
		<i>Pseudomonas cichorii</i>	Magnuson <i>et al.</i> 1990
		<i>Pseudomonas fluorescens</i> bv. I, II, V	Magnuson <i>et al.</i> 1990
		<i>Pseudomonas putida</i> bv. B	Magnuson <i>et al.</i> 1990
		<i>Salmonella</i> spp.	Loncarevic <i>et al.</i> 2005
		<i>Serratia liquefaciens</i>	Magnuson <i>et al.</i> 1990
		<i>Serratia marcescens</i>	Magnuson <i>et al.</i> 1990
		<i>Shigella sonnei</i>	Kapperud <i>et al.</i> 1995
		<i>Xanthomonas campestris</i>	Magnuson <i>et al.</i> 1990

Os microrganismos patogénicos são sobretudo introduzidos nas explorações primárias mas também podem corresponder a microrganismos com capacidade de se desenvolverem a temperaturas de refrigeração durante o armazenamento. Entre eles, *Yersinia enterocolitica* e *Listeria monocytogenes* desenvolvem-se a 0° C, *Clostridium botulinum* tipo E, F e tipo B (não-proteolítico) desenvolvem-se a 3,3°C (CAC, 1993). A desinfeção com cloro foi concebida especificamente para eliminar ou reduzir a sua ocorrência provável a um nível aceitável.

Tabela 29 – Microrganismos patogênicos isolados em alfaces (adaptado de Magnuson *et al.*, 1990).

Microrganismos patogênicos		Referência
Bactérias	<i>Clostridium botulinum</i>	Lily <i>et al.</i> , 1996.
Gram-positivas	<i>L. monocytogenes</i>	Buck <i>et al.</i> , 2003; Szabo <i>et al.</i> , 2000; Francis <i>et al.</i> , 1999; Little <i>et al.</i> , 1999; Odumeru <i>et al.</i> , 1997; Beuchat, 1996; Gras <i>et al.</i> , 1994; Salamah, 1993; Harvey and Gilmore, 1993.
	<i>Staphylococcus</i>	Buck <i>et al.</i> , 2003; Abdelnoor <i>et al.</i> , 1983.
Bactérias	<i>Aeromonas hydrophila</i>	Buck <i>et al.</i> , 2003; Szabo <i>et al.</i> , 2000; Marchetti <i>et al.</i> , 1992; Callister e Agger 1989.
Gram-negativas	<i>Campylobacter jejuni</i>	Buck <i>et al.</i> , 2003; Little <i>et al.</i> , 1999; Park e Sanders 1992.
	<i>Escherichia coli</i> O157:H7	Buck <i>et al.</i> , 2003; Little <i>et al.</i> , 1999; Lin <i>et al.</i> , 1996.
	<i>Yersinia enterocolitica</i>	Szabo <i>et al.</i> , 2000; Salamah, 1993.
	<i>Salmonella</i> spp.	Buck <i>et al.</i> , 2003; Little <i>et al.</i> , 1999; Lin <i>et al.</i> , 1996; Harvey and Gilmore, 1993.
	<i>Shigella</i>	Buck <i>et al.</i> , 2003; Little <i>et al.</i> , 1999 ; Saddik <i>et al.</i> , 1985.
	<i>Vibrio cholera</i>	Buck <i>et al.</i> , 2003; Little <i>et al.</i> , 1999.
Protozoários	<i>Cryptosporidium</i>	Monge e Chinchilla, 1996.
Vírus	Hepatite A vírus	Niu <i>et al.</i> , 1992; Rosenblum <i>et al.</i> , 1990.
	Norovirus	EFSA, 2011

Os microrganismos patogênicos de maior relevo associados ao consumo de alfaces cruas são *Salmonella* spp., *Escherichia coli* O157, *Listeria monocytogenes*, *Shigella sonnei* e Norovirus, de entre os apresentados na Tabela 29. As bactérias *Escherichia coli* O157 e *Listeria monocytogenes* são usualmente introduzidos durante a fase de cultivo das alfaces (Loncarevic *et al.*, 2005). A eliminação dos perigos biológicos subjacentes a este tipo de alimentos dependerá maioritariamente da sua qualidade microbiológica à chegada ao estabelecimento de restauração, assim como dos procedimentos e medidas de controlo introduzidos na cadeia de preparação de vegetais crus. Estas medidas de controlo deverão ser

compreensíveis, práticas e efetivas. Na Tabela 30 são identificados os perigos biológicos de acordo com as diferentes etapas levadas a cabo no estabelecimento de restauração, sendo posteriormente determinados os possíveis PCCs na Tabela 31, com o auxílio da árvore de decisão.

Tabela 30 – Identificação de perigos biológicos.

Etapas e descrição dos perigos biológicos identificados	P	S	SP	Medidas de controlo
EXPLORAÇÃO PRIMÁRIA				
Microrganismos patogénicos veiculados pelo solo, adubo, água de irrigação.	A	A	Cr	Boas práticas agrícolas. Seleção de fornecedores.
Bactérias patogénicas veiculadas por manipuladores	B	A	Me	Boas práticas de higiene. Seleção de fornecedores.
RECEÇÃO				
Contaminação cruzada por contacto dos vegetais com o solo, caixas com restos orgânicos.	B	B	Me	BPH Formação dos manipuladores
Contaminação devido a manipulação dos operadores.	B	A	Me	BPH Formação dos manipuladores
ARMAZENAMENTO				
Desenvolvimento de bactérias patogénicas a temperaturas de refrigeração.	N	A	S	Controlo das temperaturas de refrigeração
PREPARAÇÃO				
Contaminação através dos manipuladores	B	A	Me	BPH Formação dos manipuladores.
Sobrevivência de bactérias resistentes à desinfeção (ex. <i>E.coli</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Listeria</i>).	B	A	Me	Programa de lavagem e desinfeção de vegetais.
Persistência de parasitas e protozoários que não sejam eliminados na sua totalidade durante a lavagem e desinfeção	N	M	S	Programa de lavagem e desinfeção.
DISTRIBUIÇÃO				
Contaminação por manipuladores	N	M	S	BPH Formação dos manipuladores
Desenvolvimento microbiano (saladas expostas em equipamentos de frio).	N	B	S	Temperaturas de refrigeração

Legenda: P – probabilidade; S – severidade; N – negligenciável; B – baixa; M – média; A – alta;
SP – significância do perigo; S – satisfatória; Me – menor; Ma – maior; Cr – crítica.

Tabela 31 – Determinação de PCC com o auxílio da árvore de decisão (produção primária não incluída).

ETAPA	PERIGO	Q. 1	Q. 2	Q. 3	Q. 4	PC / PCC
RECEÇÃO	Contaminação cruzada por contacto dos vegetais com o solo, caixas com restos orgânicos.	Sim BPH Formação dos manipuladores	Não	Sim	Sim	PC
	Contaminação resultante da manipulação por parte dos operadores.	Sim BPH Formação dos manipuladores	Não	Sim	Sim	PC
PREPARAÇÃO	Contaminação através dos manipuladores	Sim BPH Formação dos manipuladores	Não	Sim	Sim	PC
	Sobrevivência de bactérias resistentes à desinfeção (ex. <i>E.coli</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Listeria</i>).	Sim Programa de lavagem e desinfeção de vegetais	Sim			PCC 1
DISTRIBUIÇÃO	Objetos provenientes dos próprios manipuladores (adereços, brincos, anéis, pulseiras)	Sim BPH Formação dos manipuladores	Não	Não		PC

Legenda: PC – Ponto de controlo; PCC – Ponto de controlo crítico.

Questão 1: Existe(m) medida(s) medidas de controlo para o perigo identificado? Não: então é um ponto de controlo crítico. Sim: descrever e prosseguir para a questão dois.

Questão 2 Esta etapa é específica para eliminar ou reduzir o perigo para um nível aceitável? Não: prosseguir para a questão três. Sim: então a etapa é um PCC. Identificá-lo na última coluna.

Questão 3: A contaminação do perigo identificado poderá progredir para um nível não aceitável? Não: a etapa não é um PCC. Identificá-la dessa forma na última coluna. Sim: Pode ser um PCC. Prosseguir para a questão seguinte.

Questão 4: Uma etapa posterior poderá eliminar ou reduzir o perigo identificado para níveis aceitáveis? Não: então a etapa é um PCC. Identificá-la dessa forma na última coluna e prosseguir para o próximo perigo. Sim: a etapa não é um PCC. Identificá-la dessa forma na última coluna e prosseguir para o próximo perigo.

3.5 Seleção e avaliação das medidas de controlo: estabelecimento de um programa de pré-requisitos operacionais

Com base na avaliação do perigo deve ser seleccionada uma combinação apropriada das medidas de controlo, capaz de prevenir, eliminar ou reduzir, até aos níveis de aceitação definidos, os perigos para a segurança dos alimentos.

As medidas de controlo seleccionadas devem ser classificadas quanto à necessidade de serem geridas pelo(s) programa(s) de pré-requisito(s) operacional(ais) (PPRO) ou pelo plano HACCP. A seleção e a classificação devem ser conduzidas utilizando uma abordagem lógica que inclua avaliações, respeitando o seguinte (ISO 22000, 2005):

a) o seu efeito sobre os perigos para a segurança dos alimentos;

- b) a sua exequibilidade de monitorização;
- c) o seu posicionamento relativo a outras medidas de controlo;
- d) a probabilidade de falha no funcionamento de uma medida de controlo;
- e) a severidade da(s) consequência(s) em caso de falha no seu funcionamento;
- f) se a medida de controlo está especificamente estabelecida e implementada para eliminar ou reduzir significativamente o nível do(s) perigo(s);
- g) os efeitos sinérgicos entre duas ou mais medidas.

Figura 7 - Classificação das medidas de controlo quanto à necessidade de serem geridas pelo(s) PPR(s) operacional(ais) ou pelo plano HACCP (adaptada da ISO 22000, 2005).

As medidas de controlo classificadas como pertencentes ao HACCP deverão ser implementadas de acordo com as indicações da ISO 22000 (2005). As restantes medidas de controlo devem ser implementadas como PPRs operacionais (Tabela 32) de acordo com o ponto 7.5 da ISO 22000 (2005). A Tabela 32 exemplifica a aplicação desta árvore de decisão relativamente ao ponto de controlo crítico identificado.

Tabela 32 – Classificação das medidas de controlo quanto à necessidade de serem geridas pelo(s) PPR(s) operacional(ais) ou pelo plano HACCP.

ETAPA	PERIGO	Q. 1	Q. 2	Q. 3	Q. 4	Q.5	PPRO / Plano HACCP
PREPARAÇÃO	PCC 1 Sobrevivência de bactérias resistentes à desinfeção	Sim	Sim	Não	Não	Não	PPRO

A tabela 33 exemplifica como as medidas de controlo poderão ser implementadas como PPRs operacionais.

[illegible]

1
 2
 3
 4
 5
 6
 7
 8
 9
 10
 11
 12
 13
 14
 15
 16
 17
 18
 19
 20
 21
 22
 23
 24
 25
 26
 27
 28
 29
 30
 31
 32
 33
 34
 35
 36
 37
 38
 39
 40
 41
 42
 43
 44
 45
 46
 47
 48
 49
 50
 51
 52
 53
 54
 55
 56
 57
 58
 59
 60
 61
 62
 63
 64
 65
 66
 67
 68
 69
 70
 71
 72
 73
 74
 75
 76
 77
 78
 79
 80
 81
 82
 83
 84
 85
 86
 87
 88
 89
 90
 91
 92
 93
 94
 95
 96
 97
 98
 99
 100
 101
 102
 103
 104
 105
 106
 107
 108
 109
 110
 111
 112
 113
 114
 115
 116
 117
 118
 119
 120
 121
 122
 123
 124
 125
 126
 127
 128
 129
 130
 131
 132
 133
 134
 135
 136
 137
 138
 139
 140
 141
 142
 143
 144
 145
 146
 147
 148
 149
 150
 151
 152
 153
 154
 155
 156
 157
 158
 159
 160
 161
 162
 163
 164
 165
 166
 167
 168
 169
 170
 171
 172
 173
 174
 175
 176
 177
 178
 179
 180
 181
 182
 183
 184
 185
 186
 187
 188
 189
 190
 191
 192
 193
 194
 195
 196
 197
 198
 199
 200
 201
 202
 203
 204
 205
 206
 207
 208
 209
 210
 211
 212
 213
 214
 215
 216
 217
 218
 219
 220
 221
 222
 223
 224
 225
 226
 227
 228
 229
 230
 231
 232
 233
 234
 235
 236
 237
 238
 239
 240
 241
 242
 243
 244
 245
 246
 247
 248
 249
 250
 251
 252
 253
 254
 255
 256
 257
 258
 259
 260
 261
 262
 263
 264
 265
 266
 267
 268
 269
 270
 271
 272
 273
 274
 275
 276
 277
 278
 279
 280
 281
 282
 283
 284
 285
 286
 287
 288
 289
 290
 291
 292
 293
 294
 295
 296
 297
 298
 299
 300
 301
 302
 303
 304
 305
 306
 307
 308
 309
 310
 311
 312
 313
 314
 315
 316
 317
 318
 319
 320
 321
 322
 323
 324
 325
 326
 327
 328
 329
 330
 331
 332
 333
 334
 335
 336
 337
 338
 339
 340
 341
 342
 343
 344
 345
 346
 347
 348
 349
 350
 351
 352
 353
 354
 355
 356
 357
 358
 359
 360
 361
 362
 363
 364
 365
 366
 367
 368
 369
 370
 371
 372
 373
 374
 375
 376
 377
 378
 379
 380
 381
 382
 383
 384
 385
 386
 387
 388
 389
 390
 391
 392
 393
 394
 395
 396
 397
 398
 399
 400
 401
 402
 403
 404
 405
 406
 407
 408
 409
 410
 411
 412
 413
 414
 415
 416
 417
 418
 419
 420
 421
 422
 423
 424
 425
 426
 427
 428
 429
 430
 431
 432
 433
 434
 435
 436
 437
 438
 439
 440
 441
 442
 443
 444
 445
 446
 447
 448
 449
 450
 451
 452
 453
 454
 455
 456
 457
 458
 459
 460
 461
 462
 463
 464
 465
 466
 467
 468
 469
 470
 471
 472
 473
 474
 475
 476
 477
 478
 479
 480
 481
 482
 483
 484
 485
 486
 487
 488
 489
 490
 491
 492
 493
 494
 495
 496
 497
 498
 499
 500
 501
 502
 503
 504
 505
 506
 507
 508
 509
 510
 511
 512
 513
 514
 515
 516
 517
 518
 519
 520
 521
 522
 523
 524
 525

3.6 Validação e verificação

O *Codex Alimentarius* define validação como a obtenção de evidência de que as medidas de controlo, se devidamente implementadas são capazes de controlar a ocorrência de um perigo (CAC, 2008). A norma ISO 22000 (2005) acrescenta “medidas de controlo geridas pelo plano HACCP”. Ou seja, antes da implementação de medidas de controlo a incluir no plano HACCP é preciso apurar - através de atividades de natureza científica, experimental e técnicas - se as medidas de controlo do plano HACCP são eficazes (e não de todo o sistema). Se não forem, as modificações podem incluir mudanças nas medidas de controlo (i.e. os parâmetros de processo, o nível de rigor e/ou a sua combinação) e/ou mudança(s) nas matérias-primas, nas tecnologias de fabrico, nas características do produto acabado, nos métodos de distribuição, e/ou na utilização prevista do produto acabado (ISO 22000, 2005). Por oposição, a verificação abrange todo o sistema de segurança dos alimentos: confirmação, através de evidência objetiva, de que os requisitos especificados foram satisfeitos (ISO 9000, 2005). No conceito de verificação utilizado pela CAC (1997), estão contidas um conjunto de atividades complementares, como sejam: a realização de auditorias internas, planos de amostragem, ensaios complementares à monitorização, a inspeção de registos de monitorização, registos de anomalias e da eficácia das ações corretivas.

4. EFICÁCIA DO CLORO E DO CLORO ASSOCIADO AO VINAGRE NA DESINFEÇÃO DE ALFACE

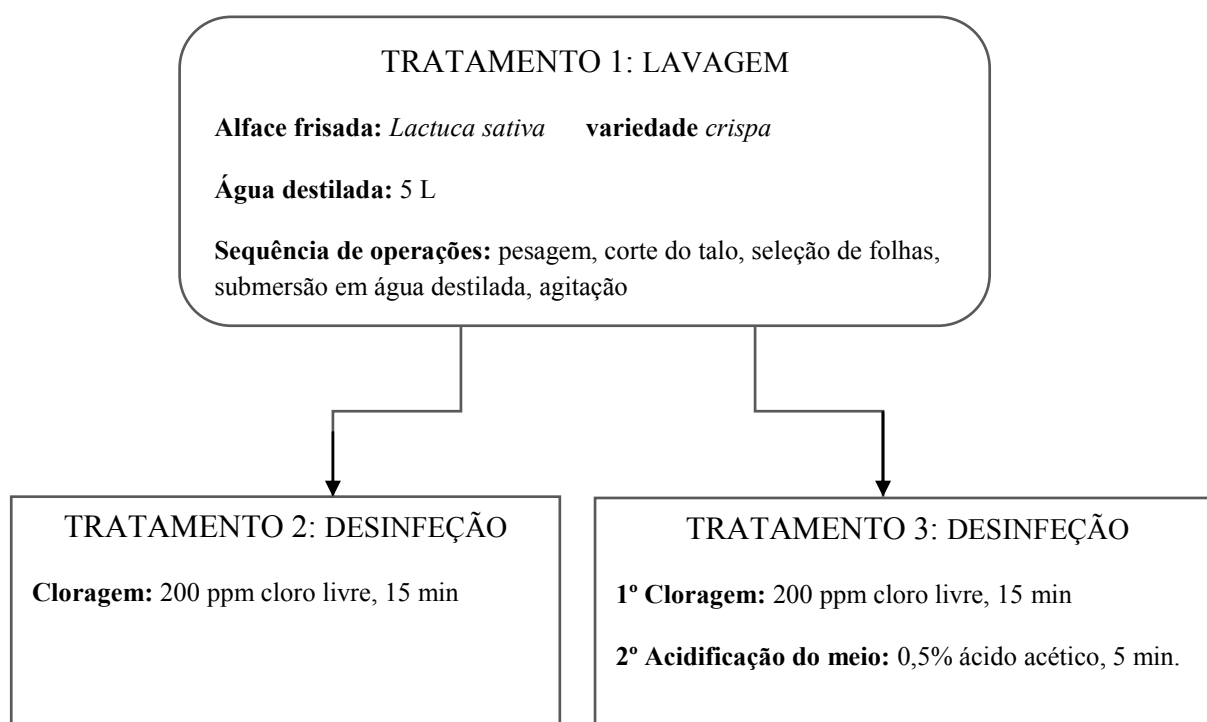
4.1 Objetivos

A parte experimental deste trabalho teve como objectivo verificar a eficácia do cloro e a eficácia de um desinfetante alternativo na desinfecção de alfaces frisadas (*Lactuca sativa* variedade *crispa*). Para tal as alfaces foram submetidas a uma lavagem prévia com água destilada para evitar a existência de cloro na água de lavagem que pudesse falsear os resultados da desinfecção. Esta lavagem das alfaces arrasta sujidade e matéria orgânica maximizando a eficácia do cloro como desinfetante.

4.2 Material e métodos

A Figura 8 representa a sequência dos tratamentos de lavagem e desinfecção a que a alface foi submetida. As alfaces utilizadas pertenciam à cantina e destinavam-se a ser servidas para consumo neste estabelecimento. Foram lavadas (tratamento 1) e desinfetadas (tratamento 2 e 3) de acordo com a Figura 8.

Figura 8 – Lavagem e desinfecção de alfaces para amostragem.



No tratamento 1 as alfaces foram lavadas à temperatura ambiente, por submersão em água destilada sob agitação. Ao terminar o tratamento 1 foi recolhida alface para análise laboratorial. Após a recolha da amostra dividiu-se a restante alface de forma homogênea por dois recipientes com igual volume de água destilada à temperatura ambiente. Metade da alface já submetida ao tratamento 1 é de seguida submetida ao tratamento 2 e a outra metade submetida ao tratamento 3.

No tratamento 2 a desinfecção da alface foi efetuada por submersão em solução de água destilada e adição de cloro, à temperatura ambiente, durante 15 minutos e sem agitação. O cloro é adicionado na forma de pastilha (Suma Diversol SW da ®JohnsonDiversey), tal como é prática na cantina em questão. Após os 15 minutos de desinfecção é recolhida uma amostra de alface para análise laboratorial relativa ao tratamento 2.

No tratamento 3 a alface foi submetida inicialmente a uma desinfecção idêntica à do tratamento 2 seguindo-se 5 minutos em que é efetuada uma acidificação do meio através da adição de ácido acético à solução clorada inicial. O ácido acético utilizado foi obtido a partir de vinagre com 6% acidez, ou seja, com 6 g de de ácido acético (CH_3COOH) por 100 mL. Como se pretendia obter uma solução desinfetante com 0,5% de ácido acético foram adicionados 83 mL de vinagre por cada litro de água destilada. No final do tratamento de desinfecção 3 é recolhida uma amostra de alface para análise laboratorial.

As amostras de alface colhidas após cada um dos tratamentos foram mantidas em refrigeração durante e até ao seu transporte para o laboratório de segurança alimentar da FMV/UTL onde foram analisadas para os seguintes parâmetros microbiológicos: contagem de microrganismos aeróbios totais a 30 °C e contagem de *Escherichia coli*.

Foram usadas 14 amostras para cada um dos tratamentos. O tamanho da amostragem foi determinado a partir do programa de estatística StatTools (<http://www.stattools.net>), e gerado a partir de uma probabilidade de erro tipo I (α) de 0,05, power (1- β) de 0,8 e de um desvio padrão (SD) de 1,5.

Uma vez que a ação desinfetante do cloro é influenciada pelo pH, este parâmetro físico-químico foi determinado nas soluções de lavagem e de desinfecção utilizadas em cada um dos tratamentos, tanto na presença como na ausência de alface.

4.2.1 Análises microbiológicas

4.2.1.1 Contagem de microrganismos aeróbios totais a 30°C

A contagem de microrganismos aeróbios totais foi realizada através de sementeira por incorporação de 1 mL de cada diluição decimal (10^{-2} a 10^{-6}) no meio de cultura *Tryptona Glucose Extract Agar* (TGA), incubado a 30 °C por 72 h, conforme a NP - 4405 /2002. Os resultados foram expressos em unidades formadoras de colónias por grama de produto analisado (ufc/g).

4.2.1.2 Contagem de *Escherichia coli*

A contagem de *Escherichia coli* foi realizada através de sementeira por incorporação de 1 mL de cada diluição decimal (10^{-2} a 10^{-3}) em meio de cultura Gelose Tergitol BCIG–5-bromo-4-cloro-3-indoxil- β -D-glucorónico incubado a 44,5° C durante 24 h, de acordo com a NP-4396 (2002). Os resultados obtidos foram expressos em unidades formadoras de colónias por grama de produto analisado (ufc/g).

4.2.2 Análises físico-químicas

4.2.2.1 Determinação de pH

Foram determinados os valores de pH das diferentes suspensões após a lavagem (com água destilada) e após a desinfecção de alfaces com água destilada clorada e com água destilada clorada combinada com ácido acético. O parâmetro pH foi determinado com o auxílio do dispositivo TruTest® (U.S. Patent n.º 6,030,842) para todas as soluções, na presença e na ausência de alface em imersão.

4.2.2.3 Análise de dados

Os dados das análises microbiológicas e físico-químicas foram tratados informaticamente numa base de dados criada no programa Microsoft Office Excel para Windows. O tratamento de dados teve por base uma análise estatística descritiva e o cálculo das percentagens relativas às diferentes reduções microbianas obtidas de acordo com o tipo de desinfecção e microrganismo.

4.3 Resultados

4.3.1 Resultados das análises microbiológicas

4.3.1.1 Resultados das contagens de aeróbios totais a 30°C

Os resultados foram obtidos com as análises efetuadas de acordo com a norma NP - 4405 (2002) e encontram-se expressos em unidades formadoras de colónias por grama (ufc/g). Estes valores encontram-se descritos no Anexo I e na Tabela 34.

Tabela 34 – Contagens de microrganismos aeróbios totais a 30 °C (ufc/g).

Amostra	AD *	AD + Cl **	AD + Cl + V ***
0	10 ⁻⁴	10 ⁻³	10 ⁻³
1	10 ⁻⁴	10 ⁻³	a)
2	10 ⁻⁴	10 ⁻³	a)
3	10 ⁻⁶	10 ⁻⁵	10 ⁻⁴
4	10 ⁻⁵	10 ⁻⁴	10 ⁻⁴
5	10 ⁻⁵	10 ⁻⁴	10 ⁻³
6	10 ⁻⁵	10 ⁻⁴	10 ⁻⁴
7	10 ⁻⁴	10 ⁻³	a)
8	10 ⁻⁴	10 ⁻³	a)
9	10 ⁻⁵	a)	a)
10	10 ⁻⁴	10 ⁻³	a)
11	10 ⁻⁵	10 ⁻³	10 ⁻³
12	10 ⁻⁴	a)	a)
13	10 ⁻⁴	a)	a)
14	a)	10 ⁻³	a)

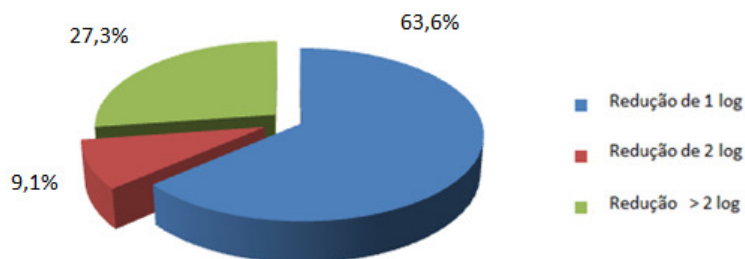
a) Não foram detetados aeróbios totais nas diluições efectuadas (10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵); *AD = água destilada; **AD + Cl = água destilada e cloro; ***AD + Cl + V = água destilada, cloro e vinagre.

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 34 observa-se uma redução crescente na carga de microrganismos aeróbios totais 30°C por cada tratamento efetuado, respetivamente: lavagem (AD), desinfeção com cloro (AD + Cl) e desinfeção com cloro e vinagre (AD + CL + V).

Nos Gráficos 1 e 2 encontram-se descritas as reduções obtidas na carga de microrganismos aeróbios totais a 30 °C em cada uma das desinfeções quando comparadas com os resultados obtidos em alfaces submetidas unicamente a lavagem.

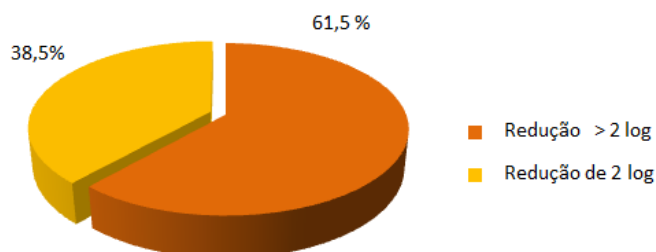
Verifica-se que a desinfeção de alfaces com água clorada resultou numa redução superior a 1 log, 2 log ou mais de 2 log comparativamente aos valores obtidos para aeróbios totais a 30 °C em alfaces lavadas com água destilada (Gráfico 1).

Gráfico 1 – Reduções obtidas na carga de microrganismos aeróbios totais a 30°C após desinfecção com água clorada.



No Gráfico 2 constata-se que os resultados obtidos pela desinfecção de alfaces em água clorada acidificada com vinagre são superiores em 2 log ou mais de 2 log comparativamente aos valores obtidos em alfaces lavadas com água destilada para aeróbios totais a 30 °C.

Gráfico 2 – Reduções obtidas na carga de microrganismos aeróbios totais a 30°C após desinfecção com água clorada combinada com vinagre.



4-3.1.2 Resultados das contagens de *Escherichia coli*

Os resultados foram obtidos a partir de análises às alfaces efetuadas de acordo com a norma NP-4396 (2002), e encontram-se expressos no Anexo II e na Tabela 35 em unidades formadoras de colónias por grama (ufc/g).

Na Tabela 35 observa-se que não foi encontrada *Escherichia coli* na maioria das amostras, com exceção de dois casos, os resultados obtidos nas amostras 11 AD e 10 AD + Cl.

Tabela 35 – Contagens de *Escherichia coli* (ufc/g)

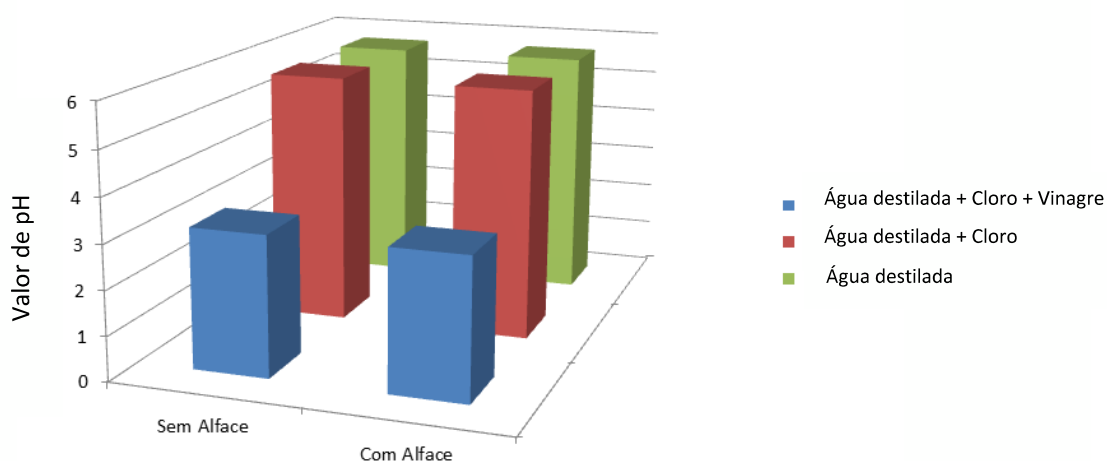
Amostra	AD *	AD + Cl **	AD + Cl + V ***
0	a)	b)	b)
1	a)	b)	b)
2	a)	b)	b)
3	a)	b)	b)
4	a)	b)	b)
5	a)	b)	b)
6	a)	b)	b)
7	a)	b)	b)
8	a)	b)	b)
9	a)	b)	b)
10	a)	10 ⁻¹	b)
11	10 ⁻¹	b)	b)
12	a)	b)	b)
13	a)	b)	b)
14	a)	b)	b)

a) Inexistência de *Escherichia coli* nas contagens efetuadas (10⁻¹, 10⁻², 10⁻³); b) Inexistência de *Escherichia coli* nas contagens efetuadas (10⁻¹, 10⁻²); *AD = água destilada; **AD + Cl = água destilada e cloro; ***AD + Cl + V = água destilada, cloro e vinagre

4.3.2 Resultados de pH

Foram determinados os valores de pH de acordo com as diferentes combinações de cloro, vinagre e água destilada. Os resultados obtidos encontram-se expressos no Gráfico 3.

Gráfico 3 – pH mediante as diferentes combinações utilizadas de cloro, vinagre e água destilada na presença e na ausência de alface em imersão.



No Gráfico 3 constata-se que os valores de pH foram semelhantes na presença e na ausência de alface. Os resultados de pH apresentados pela água destilada utilizada na lavagem das alfaces foram iguais aos resultados de pH apresentados pela solução desinfetante de água destilada clorada (5,7). A solução desinfetante de água destilada, cloro e vinagre apresentou um pH de 3,16.

5. DISCUSSÃO

Em todas as cantinas da UTL está implementada a utilização de pastilhas de cloro para a desinfecção de alfaces destinadas a serem consumidas cruas. No presente trabalho pretendeu-se enquadrar e analisar criticamente este tratamento no sistema HACCP, bem como estudar as diferenças entre a lavagem, a desinfecção com cloro e a desinfecção cloro e vinagre na redução da carga microbiana existente.

De acordo com os valores guia para a avaliação da qualidade microbiológica de alimentos prontos a comer preparados em estabelecimentos de restauração (Santos *et al.*, 2005), os resultados obtidos para as amostras de alface nas contagens de microrganismos a 30° C para todos os tratamentos foram satisfatórios (contagens inferiores a 10⁴ ufc/g de alface). Mais especificamente: as desinfecções com cloro causaram uma redução de 1 log em 63,6% das contagens de aeróbios totais (2 log em 9,1% e superior a 2 log em 27,3%). As desinfecções com solução combinada de cloro-vinagre determinaram uma redução de 2 log em 38,5% das contagens de aeróbios totais e a uma redução superior a 2 log em 61,5% destas. Ou seja, a desinfecção com cloro e vinagre mostrou-se mais eficiente na redução da população de microrganismos aeróbios totais a 30° C do que a desinfecção com água clorada. A diferença entre os dois tipos de desinfecção dever-se-à à potenciação da acção do cloro pela acidificação do meio e ao efeito desinfectante do vinagre.

Estes resultados corroboram os estudos de Sapers (2001) e Nou & Lou (2010) referindo que a desinfecção de vegetais com cloro reduz a carga microbiana entre 1 a 2 log. Os mesmos autores acrescentam que a ação do cloro é beneficiada pela presença de um pH abaixo de 6,5. Este dado levou a que neste trabalho experimental fosse recolhida uma terceira amostra de alface, sujeita a uma desinfecção com cloro a pH baixo. Esta acidificação da solução desinfetante foi conseguida através da adição de ácido acético a 0,5% à solução clorada desinfetante, tal como sugerido por Tirpanalam *et al.* (2011) e Adams *et al.* (1989). A escolha deste ácido em detrimento de outros ácidos orgânicos teve por base o trabalho dos autores supracitados mas, também teve em vista a facilidade da possível aplicação prática desta metodologia no quotidiano de um estabelecimento de restauração coletiva. O ácido acético está disponível em qualquer um destes estabelecimentos e já é utilizado na cultura popular com a finalidade de desinfetar vegetais, pelo que a sua aceitabilidade facilitaria a implementação a nível protocolar. Além de acidificar o meio maximizando a ação do cloro, o ácido acético também possui por si só atividade antimicrobiana que num substrato acidificado a pH 3 é 10 a 100 vezes superior à de qualquer ácido mineral (Laranjeira, 1998). Isto deve-se

à sua atividade lipofílica da forma não ionizada da molécula de ácido que, pela sua lipossolubilidade é capaz de penetrar a membrana das células interrompendo os processos de transporte de membrana e, ao ionizar-se no interior da célula aumenta a acidez real do meio, produzindo níveis tóxicos de ânion acetato (Laranjeira, 1998).

Não obstante, importa salientar que a desinfecção com solução combinada de vinagre e água clorada produziu alterações nas características organolépticas das alfaces tais como, odor a vinagre, alterações de textura e queimaduras em algumas folhas de alface. Este facto pode ser explicado devido à elevada acidez do meio desinfetante. Estes efeitos podem ser atenuados com a lavagem posterior à desinfecção, ou com a diminuição da concentração de ácido acético. A este propósito, segundo Baird-Parker (1980) basta 0,1% de forma não ionizada deste ácido para inibir o crescimento da maior parte das bactérias patogénicas e esporuladas devido à acidez e à velocidade de difusão (molécula pequena, pouco complexa solubiliza-se bem e difunde-se com facilidade em meio aquoso penetrando e atravessando com maior rapidez as membranas celulares). A concentração de ácido acético adotada neste trabalho foi de 0,5%, tal como sugerido por Akbas & Ölmez (2007) e superior em 0,2%. Se tivesse sido adotada uma concentração menor de ácido acético (exemplo: 0,1%) ter-se-ia utilizado um volume de vinagre menor sem alterar significativamente as características organolépticas. O vinagre é utilizado popularmente como desinfetante de vegetais, no entanto Zhang & Farber (1996) comprovaram que a sua ação desinfetante é inferior à de uma solução clorada de 100 ppm. Por este motivo não foram desinfetadas alfaces só com ácido acético neste trabalho prático..

De acordo com a terminologia adotada pelo INSA, para a contagem de *E. coli* todos os resultados foram satisfatórios (95%) ou aceitáveis (5%) nos três tratamentos (lavagem, desinfecção com cloro e desinfecção com cloro e vinagre).

Quando é detetada *E. coli* em alface crua esta pode ter origem na produção primária, nos manipuladores ou em superfícies interiores de equipamentos difíceis de higienizar ou indevidamente higienizados (Zhao *et al.*, 1997; Soriano *et al.*, 2001). Por esse mesmo motivo, de entre todas as bactérias coliformes, a *Escherichia coli* é considerada o melhor indicador de contaminação fecal e indicador de possível contaminação por bactérias patogénicas de origem entérica (Forsythe, 2010).

O resultado obtido para *E. coli* na amostra n.º 10 (desinfetada com cloro) poderá dever-se à contaminação não uniforme da amostra de alface ou a contaminação ocorrida no laboratório. Assim se explicaria que não tenha sido detetada *E. coli* nas amostras n.º 10 que só foram lavadas com água destilada ou desinfetadas com solução combinada de cloro e vinagre.

Na amostra n.º 11 foi encontrada *E. coli* numa amostra sujeita a lavagem. Este resultado indica que nesta amostra a simples lavagem com água destilada não foi eficiente na redução de *E. coli* para níveis aceitáveis. No entanto, nas mesmas amostras sujeitas a desinfecção com cloro e com solução combinada de cloro-vinagre já não foi detetada *E. coli*.

Para uma avaliação da eficácia relativa destas soluções desinfetantes na eliminação de *E. coli* seria necessário um universo de amostragem maior ou a realização de um estudo com contaminação de *E. coli* em amostras de alface.

A eficácia de inúmeros protocolos de lavagem e de diferentes métodos de desinfecção para vegetais crus tem sido abordada por diversos autores (Beuchat, 1996; Sapers, 2001; Johnston *et al.*, 2005; Tirpanalan *et al.*, 2011) no entanto a maioria dos estudos são vagos no que respeita a tempos de ação e a concentrações de desinfetantes. Na desinfecção com cloro apontam como usuais concentrações de cloro que variam de 10 e 200 ppm, com tempos de atuação entre 0,5 e 10 minutos. Por exemplo Keskinen *et al* (2009) referem a utilização de 20 ppm de cloro, Casteel *et al.* (2008) 10, 20 e 200 ppm de cloro, Zhang & Farber (1996) 25, 50 e 100 ppm de cloro, Watada & Qi (1999) 150 ppm e Wu *et al.* (2000) referem 250 ppm.

A questão de saber “qual a concentração mínima eficaz de cloro” para uma desinfecção eficiente surgiu no decorrer do presente trabalho e foi adotada a concentração de 100 ppm de cloro sustentada pelos estudos efetuados por Adams *et al.* (1989), Zhang & Farber (1996), Parish *et al.* (2003) e Das *et al.* (2011).

Mais consensual é a neutralização do cloro. Quando o cloro reage com a matéria orgânica sofre alguma inativação por parte desta (Luo *et al.*, 2010). Ou seja, a concentração esperada de cloro aproximar-se-á da concentração de cloro livre quanto menor for a quantidade de matéria orgânica inativadora presente na alface (Virto *et al.*, 2005). Para atenuar este efeito deve proceder-se à lavagem da alface previamente à desinfecção com cloro de forma a reduzir substancialmente a sujidade e a matéria orgânica que inativaria grandes concentrações de cloro. Não obstante a importância desta primeira lavagem na redução da matéria orgânica, Casteel *et al.* (2008) salientam que os diferentes tipos de vegetais têm uma demanda inicial de cloro que varia entre si, ter esta informação relativamente à alface seria interessante mas também a este respeito a informação disponível é pouca. Um outro aspeto importante consiste no momento em que é efetuada a desinfecção. Luo *et al.* (2010) defendem que a alface acabada de cortar liberta grandes quantidades de matéria orgânica neutralizando a ação do cloro, por isso a desinfecção da alface deve fazer-se antes do corte. Os mesmos autores contaminaram artificialmente alfaces cortadas e inteiras com estirpes de *E. coli* O157:H7 e constataram uma diferença de 1 log. Estes cuidados foram seguidos nas amostras analisadas mas esta prática não é adotada nas cantinas universitárias. Ou seja, nas alfaces que são desinfetadas após

lavagem e corte é mais difícil atingir a concentração de cloro pré-definida. No presente trabalho prático foi também utilizada água destilada para evitar que a água da rede interferisse com a concentração de cloro estipulada.

Não foi possível identificar a proveniência das alfaces analisadas para caracterizar o tipo de cultura (biológico ou convencional, estufa ou exterior, tipo de rega e fertilizantes utilizados). Esta informação seria relevante para a avaliação do risco. Mukherjee *et al.* (2004) correlacionam os diferentes tipos de cultura de alface e a qualidade microbiológica final das alfaces, identificando que explorações com produção biológica de alface apresentaram aproximadamente 22,4% de amostras positivas para *E. coli* enquanto as explorações convencionais apresentam uma prevalência de *E. coli* de 1,6%. Esta diferença é muito significativa e poderá estar associada ao tipo de adubação utilizada em cada um dos casos. Estes valores indicando-nos que o risco de toxinfecção alimentar é muito superior nas alfaces provenientes de explorações com produção biológica. A este propósito, a análise das toxinfecções alimentares associadas a este vegetal aponta para a contaminação deste alimento nas explorações primárias: *Escherichia coli* 0157:H7 (Magnuson *et al.*, 1990; CDR, 1997; CDC, 2012), *Salmonella* spp. (Magnuson *et al.*, 1990), *Shigella sonnei* (Davis *et al.*, 1988; Kapperud *et al.*, 1995), *Campylobacter jejuni* (WHO, 1998; CDC, 1998) e vírus da Hepatite A (Buck *et al.*, 2003). A FDA reforça esta ideia assinalando que 2 em cada 116 amostras de alface importada (1,7%) eram positivas para *Salmonella* e *Shigella* (FDA, 2001) e que 1 em cada 142 amostras de alfaces da sua produção nacional (0,7%) eram positivas para *Salmonella* (FDA 2003).

O fornecimento de vegetais microbiologicamente seguros implica a obtenção de compromisso de todas as partes envolvidas na chegada dos vegetais até ao consumidor. Os estabelecimentos de restauração colectiva respondem a esta questão através da escolha de fornecedores e da implementação da metodologia HACCP.

Com a criação de um sistema de segurança dos alimentos aplicável a alfaces destinadas a serem consumidas cruas verificou-se que os pré-requisitos são fáceis de implementar e tornou-se também visível o importante papel que desempenham a formação dos manipuladores e as BPH num estabelecimento de restauração coletiva. Isto vai de acordo com o sustentado por Baş *et al.* (2005) que indicam que a falta de formação dos operadores como uma das principais barreiras à implementação desta metodologia. Estes defendem que existe dificuldade em fazer compreender aos manipuladores a necessidade de controlo e monitorização de determinadas tarefas. Os mesmos autores defendem que também a falta de tempo para execução de tarefas, a elevada rotatividade de pessoal e a falta de motivação dos manipuladores podem dificultar a implementação de um sistema de segurança sanitária.

Neste trabalho verificou-se também que a metodologia HACCP introduz o problema da severidade e da probabilidade para a determinação de pontos críticos. Esta avaliação apresenta um elevado grau de subjectividade e existem poucos dados para sustentar a classificação efetuados pelos técnicos na determinação da significância do perigo.

No programa de pré-requisitos operacionais para vegetais consumidos crus proposto a única medida de controlo sugerida foi o programa de lavagem e desinfecção de vegetais. A grande dificuldade está na sua monitorização. A compra de equipamentos fiáveis para monitorização das concentrações de cloro é demasiado dispendioso e a introdução dessas medições na rotina de um estabelecimento de restauração colectiva seria difícil. Por este motivo optou-se por uma monitorização que tem em conta o volume de água utilizada, número de pastilhas de cloro e tempo de acção. Embora persista alguma incerteza sobre a concentração de cloro atingida garante-se com a lavagem e com a desinfecção a redução dos perigos biológicos para níveis aceitáveis. O grande problema está nas situações atípicas, usualmente com consequências gravíssimas como o surto de *E. coli* que ocorreu na Alemanha em que morreram 53 pessoas (EFSA, 2011). Por este mesmo motivo a extensão da metodologia HACCP às explorações primárias deve ser equacionada. Dados europeus e americanos comprovam os grandes benefícios obtidos na redução de doenças alimentares, que teve a implementação de controlo desde a produção primária até ao consumidor (Vieiros *et al.*, 2009). Nos Estados Unidos foi desenvolvida uma orientação definindo boas práticas a serem tomadas em relação aos riscos de contaminação microbiológica de vegetais, incluindo boas práticas agrícolas de gestão durante o crescimento, embalagem e transporte de vegetais (Johnston *et al.*, 2005). A CAC desenvolveu o código *Hygienic Practices for Fresh Fruits and Vegetables* e os anexos *Ready-to-Eat Fresh Pre-cut Fruits and Vegetables* e o *Sprout Production* (SCF, 2002). No entanto, estes são vagos relativamente às medidas a serem tomadas e relativamente aos critérios microbiológicos a serem atingidos. A aplicação do sistema HACCP para a produção de vegetais microbiologicamente seguros é considerada problemática, particularmente na identificação de Pontos de Controlo Críticos (PCC) suficientemente robustos para permitirem a destruição de agentes patogénicos e na manutenção de registos sobre as medidas tomadas relativamente a cada PCC. Com ou sem sistemas HACCP nas explorações primárias, Gagliardi *et al.* (2003) referem a necessidade de controlar e monitorizar a qualidade das águas de irrigação dada a grande importância que estas podem ter como fontes de contaminação bacteriana. As explorações deveriam fornecer informação sobre o tipo de adubos utilizados: orgânicos ou inorgânicos e a este nível deveriam ser efetuados mais estudos relativamente às implicações que estes têm nas características microbiológicas finais dos vegetais. No entanto, isto poderia traduzir-se num

aumento dos custos de produção e no preço do produto final. Não obstante, do ponto de vista do consumidor a alface e a generalidade dos vegetais crus são tidos como alimentos seguros e, ao contrário dos estabelecimentos de restauração coletiva, a generalidade dos estabelecimentos de restauração tradicional não procede à sua desinfeção. Esta contradição vai ao encontro de um parecer não vinculativo da Comissão Europeia (2005) que facilita a implementação dos princípios HACCP em determinadas atividades do setor alimentar como a restauração. De facto a aplicação desta metodologia em determinadas atividades é controversa. Além de um certo grau de complexidade na conceção do sistema (constituição de uma equipa de segurança alimentar, identificação de perigos, determinação de PCC), os PCC podem ser difíceis de monitorizar (os limites críticos podem ser fáceis de estabelecer mas difíceis de medir como é o caso da concentração de cloro na solução desinfetante). Por exemplo, dos cinco sistemas de segurança dos alimentos implementados nas unidades de restauração coletiva, só um concretizou a concentração de cloro livre necessária para a desinfeção de vegetais procedendo a verificações periódicas. Os restantes faziam-no de uma forma indireta. Ou seja, instruindo um determinado número de pastilhas de cloro para um determinado volume de água obtendo a concentração desejada. Mas ela terá sido atingida? Mesmo procedendo à validação do processo, a orgânica dos estabelecimentos de restauração é pouco permeável a protocolos rígidos. Numa lógica industrial esta abordagem será mais fácil mas deve ser acompanhada por mais instruções como a determinação do número máximo de alfaces a desinfetar por volume de água, a lavagem prévia, ou o corte posterior à desinfeção. Outro aspeto importante são os critérios microbiológicos. A fim de contribuir para a proteção da saúde pública e evitar interpretações divergentes, a União Europeia estabeleceu critérios de segurança harmonizados em matéria de aceitabilidade dos alimentos, designadamente no que se refere à presença de certos microrganismos patogénicos, e critérios de higiene dos processos em que se estabelece um valor de contaminação indicativo, acima do qual se tornam necessárias medidas corretivas para preservar a higiene do processo em conformidade com a legislação alimentar (Regulamento (CE) n.º 2073/2005).

Todavia para muitos alimentos não foram ainda estabelecidas diretrizes internacionais relativas a critérios microbiológicos. Nesses casos, a generalidade dos laboratórios de microbiologia alimentar em Portugal segue os valores guia estabelecidos pelo INSA (Santos *et al.*, 2005). Os dados obtidos por este organismo de referência permitiram agrupar os alimentos prontos a comer em três grupos diferentes, de acordo com o tipo de ingredientes que entram na sua composição, o tratamento térmico ou outro procedimento que lhe é aplicado. Resultou desta análise a constituição do grupo 3 que agrega alface, tomate, cenoura, couve roxa, salada de frutas, fruta ao natural laminada e morangos. Ora, a definição dos

mesmos critérios microbiológicos para raízes, caules ou folhas não considera as grandes diferenças nas contagens obtidas e o seu estado microbiológico no momento do consumo (Aycicek *et al.*, 2006). Ou seja, um vegetal apresentará uma diferente qualidade microbiológica conforme o seu crescimento ocorra no solo (ex. cenoura), à superfície deste (ex. alface) ou sem nunca contactar com ele (ex. tomate, curgete). Por exemplo de acordo com o estudo desenvolvido por Abadias *et al.* (2007) a cenoura, por se desenvolver no solo e diretamente em contacto com fertilizantes e águas de rega, apresenta usualmente contagens muito elevadas de aeróbios totais, na ordem de 7,8 log ufc/g, o que implica uma avaliação não satisfatória de acordo com os valores estipulado como valor guia (Santos *et al.*, 2005). No entanto, esta carga microbiana não implica que o consumo de cenouras cruas seja um perigo para o consumidor. Existe sim, uma diferença na microbiota que caracteriza os diferentes vegetais e que é uma consequência inevitável do local onde estes se desenvolvem e crescem. No entanto, esta microbiota atinge um equilíbrio, criando competição o que, pode eventualmente evitar o desenvolvimento de microrganismos patogénicos (Watada & Qi, 1999; Parish *et al.*, 2003). Bennik *et al.* (1996) reportaram que a *Listeria monocytogenes* se desenvolvia melhor em endívias desinfetadas, em que se reduzia a microbiota natural do vegetal, que em endívias não desinfetadas. Em síntese, a procura de um enquadramento normativo que permita agrupar a microbiologia de raízes, folhas e frutos afigura-se muito difícil. Talvez por isso não foram ainda estabelecidos para muitos vegetais diretrizes internacionais relativas a critérios microbiológicos.

6. CONCLUSÃO

Da discussão anterior e da análise da bibliografia consultada, verifica-se que os resultados obtidos são consentâneos com as mais recentes investigações realizadas neste campo. O estudo realizado no âmbito deste trabalho conduziu às conclusões a seguir enumeradas:

- As reduções obtidas nas contagens de aeróbios totais a 30°C após as desinfecções com cloro foram significativas (entre 1 a 2 log ufc/g);
- As reduções obtidas nas contagens de aeróbios totais a 30°C após as desinfecções com a solução combinada de cloro e vinagre foram significativas (iguais ou superiores a 2 log ufc/g);
- A adição de vinagre à solução clorada, na concentração de 0,5% ácido acético, potencia a ação do cloro mas altera as características organoléticas da alface.

O segundo aspeto, que se pode salientar nesta dissertação, é facto de existir dificuldade na aplicação à alface destinada a ser consumida crua dos procedimentos baseados nos princípios HACCP em restauração coletiva. A legislação comunitária permite que os requisitos do sistema HACCP tenham flexibilidade suficiente para serem aplicáveis em todas as situações o implica que não é necessário, por exemplo, fixar um limite numérico como seria o caso da concentração de cloro expressa em ppm. Será difícil efetuar-lo de outra forma, mas esta orientação determina um grau de subjetividade considerável no conhecimento das concentrações reais de cloro atingidas aquando do processo de desinfecção. Outro aspeto prende-se com o conhecimento dos perigos de natureza biológica. A lavagem por si só será suficiente ou as alfaces devem desinfetar-se sempre? É difícil dar respostas considerando que cada perigo para a segurança sanitária dos alimentos deve ser avaliado de acordo com a probabilidade da sua ocorrência e sobre isso pouco se sabe. Os sistemas de segurança dos alimentos são da responsabilidade dos operadores das empresas do setor alimentar, mas enquanto este regime não for estendido à produção primária, os operadores a “jusante” pouco saberão sobre as práticas agrícolas adotadas e ainda menos sobre as prevalências dos agentes patogénicos presentes nos alimentos, sendo esta questão especialmente preocupante para alimentos, que tal como a alface, não são submetidos a tratamento térmico.

7. BIBLIOGRAFIA

- Abadias, M., Usall, J., Anguera, M., Solsona, C., Viñas, I. (2008). Microbiological quality of fresh, minimally-processed fruit and vegetables, and sprouts from retail establishments. *International Journal of Food Microbiology*, 123, 121-129.
- Adams, M. R., Hartley, A. D., Cox, L. J. (1989). Factors affecting the efficacy of washing procedures used in the production of prepared salads. *Food Microbiology*, 6, 269–277.
- Akbas, M. Y., Ölmez, H. (2007). Inactivating of *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* on iceberg lettuce by dip wash treatments with organic acids. *Letters in Applied Microbiology*, 44, 619-624.
- Allende, A., Artes, F. (2003) UV-radiation as a novel technique for keeping quality of fresh processed ‘LolloRosso’ lettuce. *Food Research International*, 36, 739-746.
- Aycicek, H., Oguz, U., Karci, K. (2006). Determination of total aerobic and indicator bacteria on some raw eaten vegetables from wholesalers in Ankara, Turkey. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 209, 197-201.
- Baird-Parker, A. C. (1980). Organic acids. *Microbial Ecology of Foods*, 1, 126-135.
- Baş, M., Yüksel, M., Çavuşoğlu, T. (2005). Difficulties and barriers for the implementing of HACCP and food safety systems in food businesses in Turkey. *Food Control*, 18, 124-130.
- Bennik, M. H. J., Peppelenbos, H. W., Nguyen-the, C., Carlin, F., Smid, E. J., Goriis, L. G. M. (1996). Microbiology of minimally processed, modified-atmosphere packaged chicory endive. *Postharvest Biology and Technology*, 9, 209-221.
- Beuchat, L. R. (1996). Pathogenic microorganisms associated with fresh produce. *Journal of Food Protection*, 59, 204-216.
- Beuchat, L. R. (1997). Comparison of chemical treatments to kill *Salmonella* on alfalfa seeds destined for sprout production. *International Journal of Food Microbiology*, 34, 329–333.
- Beuchat, L. R., Nail, B. V., Adler, B. B., Clavero, M. R. (1998). Efficacy of spray application of chlorinated water in killing pathogenic bacteria on raw apples, tomatoes, and lettuce. *Journal of Food Protection*, 61, 1305–1311.
- Bell, K. Y., Cutter, C. N., Sumner, S. S. (1997). Reduction of foodborne micro-organisms on beef carcass tissue using acetic acid, sodium bicarbonate, and hydrogen peroxide spray washes. *Food Microbiology*, 14, 439-448.

Buck, J.W., Walcott, R. R., Beuchat, L. R. (2003). Recent trends in microbiological safety of fruits and vegetables. *Plant Health Progress*.

CAC (1993). *Code of hygienic practices for precooked and cooked foods in mass catering*. CAC/RCP 39-1993. Roma: *Codex Alimentarius Commission*.

CAC (1997). Hazard analysis and critical control point (HACCP) system and guidelines for its application. *Codex Alimentarius Commission*.

CAC (2003). Recommended international code of practice general principles of food hygiene. CAC/RCP 1-1969, Rev. 4-2003. Roma: *Codex Alimentarius Commission*.

CAC (2008). Guidelines for the validation of food safety control measures. CAC/GL 69-2008. Roma: *Codex Alimentarius Commission*.

Caldas da Fonseca, S., Bernardo de Moraes, A.M. (2000). Boas práticas pós-colheita para hortícolas frescos. *Escola Superior de Biotecnologia da Universidade Católica*, 41-45.

Carvalho, M. S. G. T. (2008). Survival of drinking water pathogens after disinfection – Dissertation for PhD Degree in Chemical and Biological Engineering. *Universidade do Minho e Universidade de Southampton*.

Casteel, M. J., Schmidt, C. E., Sobsey, M. D. (2008). Chlorine disinfection of produce to inactivate Hepatitis A virus and Coliphage MS2. *International Journal of Food Microbiology*, 125, 267-73

CDC (2004). Diagnosis and management of foodborne illness: a primer for physicians. Disponível em: <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/rr5304a1.htm>. Acedido a 12 Novembro 2012

CDC (2008). Guideline for disinfection and sterilization in healthcare facilities. Disponível em: http://www.cdc.gov/hicpac/Disinfection_Sterilization/table_2.html. Acedido a 1 Junho 2012

CDC (2010). Multistate outbreak of human *E. coli* O145 infections linked to shredded Romaine lettuce from a single processing facility. Disponível em: http://www.cdc.gov/ecoli/2010/ecoli_o145/index.html. Acedido a: 16 Fevereiro 2013.

CDC (2012). Multistate outbreak of *E. coli* O157:H7 infections linked to Romaine lettuce. Disponível em: <http://www.cdc.gov/ecoli/2011/ecoliO157/romainelettuce/032312/index.html>. Acedido a: 16 Fevereiro 2013.

Chang, J. M., Fang, T. J. (2007). Survival of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* serovars *Typhimurium* in iceberg lettuce and the antimicrobial effect of rice vinegar against *E. coli* O157:H7. *Food Microbiology*, 24, 745-751.

Davis, H., Taylor, J. P., Perdue, J. N., Humphreys, Jr. G. N., Rowntree, R., Greene, K. D. (1988). A *Shigellosis* outbreak traced to commercially distributed shredded lettuce. *Am J. Epidemiology*, 128, 1312-1221.

Das, B. K., Kim, J. G., Choi, J. W. (2011). Edge browning and microbial quality of fresh-cut iceberg lettuce with different sanitizers and contact times. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 17, 55-62.

EFSA (2011). *E.coli*: Rapid response in a crisis. Disponível em: <http://www.efsa.europa.eu/en/press/news/120711.htm>. Acedido a: 27 Março 2013

EFSA (2011). Scientific Opinion on an update on the present knowledge on the occurrence and control of foodborne viruses. Disponível em: <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/2190.pdf> Acedido a 23 Junho 2013.

EFSA (2011). Shiga toxin and verotoxin-producing *Escherichia coli* in humans, food and animals in the EU, with special reference to the German outbreak strain STEC O104. Disponível em: <http://www.efsa.europa.eu/en/supporting/pub/166e.htm>. Acedido a 10 Junho 2012.

EFSA (2011). The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2011. Disponível em: <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/3129.pdf> Acedido a 23 Junho 2013.

European Commission, Health & Consumer Protection Directorate-General (2002). Opinion of the scientific committee on veterinary measures relating to public health - On Norwalk-like viruses. Disponível em: http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scv/out49_en.pdf. Acedido a: 15 Junho 2012

European Commission, Health & Consumer Protection Directorate-General (2005). Guidance document on the implementation of procedures based on the HACCP principles, and on the facilitation of the implementation of the HACCP principles in certain food businesses. Disponível em: ec.europa.eu/food/.../guidance_doc_haccp_en.pdf. Acedido a: 26 Março 2013.

FDA (1998). Guide to minimize microbial food safety hazard for fresh and vegetables. *Food and Drug Administration, U.S. Department of Health & Human Services*. Disponível em: <http://vm.cfsan.fda.gov/~dms/prodguid.html>. Acedido a 10 Junho 2012.

FDA (2001). Survey of imported fresh produce. *Food and Drug Administration, U.S. Department of Health & Human Services*. Disponível em: <http://www.fda.gov/Food/FoodSafety/Product-SpecificInformation/FruitsVegetablesJuices/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/ucm118891>. Acedido a 10 Junho 2012.

FDA (2003). Survey of domestic fresh produce. *Food and Drug Administration, U.S. Department of Health & Human Services*. Disponível em:

<http://www.fda.gov/Food/FoodSafety/Product-SpecificInformation/FruitsVegetablesJuices/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/ucm118306.htm>. Acedido a 10 Junho 2012.

Foley, D. M., Dufour, A., Rodriguez, L., Caporaso, F., Prakash, A. (2002). Reduction of *Escherichia coli* 0157:H7 in shredded iceberg lettuce by chlorination and gamma irradiation. *Radiation Physics and Chemistry*, 63, 391-396.

Fonseca, J. M. (2005). Microbial quality of iceberg lettuce is affected by moisture at harvest. *Report from the University of Arizona - Yuma Agriculture Center*.

Food Standards (2001). Guidelines for the microbiological examination of ready-to-eat foods. Consultado em: <http://www.foodstandards.gov.au/scienceandeducation/publications/guidelinesformicrobi1306.cfm>. Acedido a: 16 Fevereiro 2013.

Forsythe, Stephen J. (2010). Microbiology of safe food. *Wiley-Blackwell Editions*, 4, 152-153.

Gagliardi, J. V., Millner, P. D., Lester, G., Ingram, D. (2003). On-farm and postharvest processing sources of bacterial contamination to melon rinds. *Journal of Food Protection*, 66, 82-87.

Hedberg, C. W., MacDonald, K. L., Osterholm, M. T. (1993). Foodborne illness in the 1990s. *The Journal of the American Medical Association*, 271, 269.

Hiisvirta, L., Kruithof, J. C., van Puffelen, J. (1994). Disinfection and disinfection by-products. *WHO Seminar Pack For Drinking Water Quality*, 12, 1-2.

IC Controls (2005). Chlorine theory & measurement. *Technical notes*. Edição 8. Disponível em: <http://www.iccontrols.com/files/8-2.pdf>. Acedido a: 12 Junho 2012.

ISO 9000 (2005). Sistemas de gestão da qualidade – Fundamentos e vocabulário. *International Organization for Standardisation*. Genebra.

ISO 22000 (2005). Sistema de gestão da segurança alimentar. Requisitos para qualquer organização que opere na cadeia alimentar. *International Organization for Standardisation*. Genebra.

Issa-Zacharia, A., Kamitani, Y., Muhimbula, H. S., Ndabikunze, B. K. (2010). A review of microbiological safety of fruits and vegetables and the introduction of electrolyzed water as an alternative to sodium hypochlorite solution. *African Journal of Food Science*, 4, 778-789.

Johnston, L. M., Jaykus, L., Moll, D., Martinez, M. C., Anciso, J., Mora, B., Moe, C. L. (2005). A field study of the microbiological quality of fresh produce. *Journal of Food Protection*, 68, 1840-1847.

Jones, T. F., Imhoff, B., Samuel, M., Mshar, P., McCombs, K. G., Hawkins, M., Denee, V., Cambridge, M., Olsen, S. J. (2004). Limitations to successful investigation and reporting of foodborne outbreaks: an analysis of foodborne disease outbreaks in foodnet catchment areas, 1998–1999. *Foodborne Outbreaks*, 38, 297-302.

Jongen W. (2005). Alternatives to hypochlorite washing systems for the decontamination of fresh fruit and vegetables in improving the safety of fresh fruit and vegetables. *Woodhead Publishing Limited and CRC Press, Cambridge*, 351-372.

Kapperud, G., Rorvik, L. M., Hasseltvedt, V., Hoiby, E. A., Iversen, B. G., Staveland, K., Johnsen, G., Leitão, J., Heriskstad, H., Andersson, Y. (1995). Outbreak of *Shigella sonnei* infection traced to imported iceberg lettuce. *Journal of Clinical Microbiology*, 33, 609-614.

Karapinar, M., Gönü, S. A. (1992). Removal of *Yersinia enterocolitica* from fresh parsley by washing with acetic acid or vinegar. *International Journal of Food Microbiology*, 16, 261-264.

Keskinen, L. A., Burke, A., Annous, B. A. (2009). Efficacy of chlorine, acidic electrolyzed water and aqueous chlorine dioxide solutions to decontaminate *Escherichia coli* O157:H7 from lettuce leaves. *International Journal of Food Microbiology*, 132, 134-140.

Kim, S. Y., Kang, D. H., Kim, J. K., Ha, J. Y., Kim, T., Lee, S. H. (2011). Antimicrobial activity of plant extracts against *Salmonella* Typhimurium, *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* on Fresh lettuce. *Journal of Food Science*, 76, 41-46.

Koseki, S., Yoshida, K., Isobe, S., Itoh, K. (2001). Decontamination of lettuce using acidic electrolyzed water. *Journal of Food Protection*, 64, 652-658.

Krometis, L. A., Characklis, G. W., Drummey, P. N., Sobsey, M. D. (2010). Comparison of the presence and partitioning behavior of indicator organisms and *Salmonella* spp. in an urban watershed. *Journal of Water Health*, 8, 44-59.

Laranjeira, Cristina M. C. (1998). Introdução monográfica à indústria vinagreira. *Universidade Técnica de Lisboa*. 147-153.

Loncarevic, S., Johannessen, G. S., Rorvik, L. M. (2005). Bacteriological quality of organically grown leaf lettuce in Norway. *Letters in Applied Microbiology*, 41, 186-189.

Lou, Y., Nou, X., Yang, Y., Alegre, I., Turner, E., Feng, H., Abadias, M., Conway, W. (2010). Determination of free chlorine concentration needed to prevent *Escherichia coli* O157:H7 cross-contamination during fresh-cut produce wash. *Journal of Food Protection*, 74, 352-358.

Magnuson, J. A., King, A. D., Torok, T. (1990). Microflora of partially processed lettuce. *Applied and Environmental Microbiology*, 56, 3851-3854.

Mahmound, B. S. M. (2010). Effects of x-ray radiation on *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enteric*, and *Shigella flexneri* inoculated on shredded iceberg lettuce. *Food Microbiology*, 27, 109-114.

Meyer, S. T. (1994). Chlorine use in water disinfection, trihalomethane formation, and potential Risk to Public Health. *Cadernos de Saúde Pública*, 10, 99-110.

Mukherjee, A., Speh, D., Dyck, E., Diez-Gonzales, F. (2004). Preharvest evaluation of coliforms, *Escherichia coli*, *Salmonella* e *Escherichia coli* O157:H7 in organic and conventional produce grown by Minnesota farmers. *Journal of Food Protection*, 67, 894-900.

Norton, C. D., LeChevallier, M. W. (2000). A pilot study of bacteriological population changes through potable water treatment and distribution. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 268-276.

Nou, X., Lou, Y. (2010). Whole-leaf wash improves chlorine efficacy for microbial reduction and prevents pathogens cross-contamination during fresh-cut lettuce processing. *Journal of Food Science*, 75, 283-290.

NP - 4396 (2002). Norma Portuguesa de Microbiologia alimentar: Regras gerais para a contagem de *Escherichia coli*. Método corrente. *Instituto Português da Qualidade*. Lisboa.

NP - 4405 (2002). Norma Portuguesa de Microbiologia alimentar: Regras gerais para a contagem de microrganismos. Contagem de colónias a 30 °C. *Instituto Português da Qualidade*. Lisboa.

NSW Food Authority (2009). Microbiological quality guide for ready-to-eat foods. Disponível em: http://www.foodauthority.nsw.gov.au/_Documents/science/microbiological_quality_guide_for_RTE_food.pdf. Acedido a: 16 Fevereiro 2013.

Oh, S. W., Dancer, G. I., Kang, D. H. (2005). Efficacy of aerosolized peroxyacetic acid as a sanitizer of lettuce leaves. *Journal of Food Protection*, 68, 1743-1747.

Ölmez, H. (2010). Effect of different sanitizing methods and incubation time and temperature on inactivation of *Escherichia coli* on lettuce. *Journal of Food Safety*, 30, 228-299.

Ölmez, H., Kretzchmar, U. (2009). Potential alternative disinfection methods for organic fresh-cut industry for minimizing water consumption and environmental impact. *LWT - Food Science and Technology*, 42, 686-693.

Parish, M. E., Beuchat, L. R., Suslow, T. V., Harris, L. J., Garret, E. H., Farber, J. N., Busta, F. F. (2003). Methods to reduce/ eliminate pathogens from fresh and fresh-cut produce. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2, 161-173.

Park, C. M., Beuchat, L. R. (1999) Evaluation of sanitizers for killing *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* and naturally occurring microorganisms on cantaloupes, honeydew melons, and asparagus. *Dairy, Food and environmental Sanitation*, 19, 842-847.

Park, E. J., Alexandre, E., Taylor, G. A., Costa, R., Kang, D. H. (2008) Effect of electrolyzed water for reduction foodborne pathogens on lettuce and spinach. *Journal of Food Science*, 73, 268-272.

Pinto, R. S. B. F. F. (2007). Hortas urbanas: espaços para o desenvolvimento sustentável de Braga. Tese de Mestrado em Engenharia Municipal. Área de Especialização em Planeamento Urbanístico. *Universidade do Minho*.

Rajkowski, K. T., Fan, X. (2008). Microbial quality of fresh-cut iceberg lettuce washed in warm or cold water and irradiated in a modified atmosphere package. *Journal of Food Safety*, 28, 248-260.

Regulamento (CE) N.º 178/2002. Jornal Oficial da União Europeia, L31; Bruxelas, Bélgica; pp – 24.

Regulamento (CE) N.º 1881/2006. Jornal Oficial da União Europeia, L364; Bruxelas, Bélgica; 5-24.

Regulamento (CE) N.º 852/2004. Jornal Oficial da União Europeia, L226; Bruxelas, Bélgica; pp – 21.

Regulamento (CE) N.º 2073/2005. Jornal Oficial da União Europeia, L338; Bruxelas, Bélgica; pp – 26.

Regulamento (CE) N.º 1086/2011. Jornal Oficial da União Europeia, L281; Bruxelas, Bélgica; pp - 11.

Rodgers, R. L., Cash, L. N., Siddiq, M., Ryser, E. T. (2004) A comparison of different chemical sanitizers for inactivating *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* in solution and on apples, lettuce, strawberries and cantaloupe. *Journal of Food Protection*, 67, 721-731.

Rosa, M., Raybaudi-Masilia, Mosqueda-Melgar, J., Soliva-Fortuny, R., Martin-Belloso, O. (2009) Control of pathogens and spoilage microorganisms in fresh-cut fruits and fruit juices by traditional and alternative natural antimicrobials. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 8, 157-180.

Sapers, G. M. (2001). Efficacy of washing and sanitizing methods for disinfection of fresh fruit and vegetable products. *Food Technology and Biotechnology*, 39, 305-311.

Santos, M. I., Correia, C., Cunha, M. I., Saraiva, M. M., Novais, M. R. (2005). Valores Guia para a avaliação da qualidade microbiológica de alimentos prontos a comer preparados em estabelecimentos de restauração. *Revista da Ordem dos Farmacêuticos*, 64, 66-69.

SCF (2002). Risk profile on the microbiological contamination of fruits and vegetables eaten raw expressed on 29 April 2002. Disponível em:
http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out125_en.pdf. Acedido a: 20 Abril 2012.

Singh, N., Singh, R. K., Bhunia, A. K., Stroshine, R. L. (2002) Efficacy of chlorine dioxide ozone and thyme essential oil or a sequential washing in killing *Escherichia coli* O157:H7 on lettuce and baby carrots. *LWT Food Science and Technology*, 35, 720-729.

Soriano, J. M., Rico, H., Molto, J. C., Mañes, J. (2001). Incidence of microbial flora in lettuce, meat and Spanish potato omelet from restaurants. *Food Microbiology* 18, 159-163.

Steinbruegge, E. G., Maxey, R. B., Liewen, M. B. (1988). Fate of *Listeria monocytogenes* on ready to serve lettuce. *Journal of Food Protection*, 51, 207-213.

Sy, K. V., Melinda, B., Murray, M., Harrison, D., Beuchat, L.R. (2005). Evaluation of gaseous chlorine dioxide as a sanitizer for killing *Salmonella*, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, and yeasts and molds on fresh and fresh-cut produce. *Journal of Food Protection*, 58, 1176-1187.

Takeuchi, k., Frank, J. F. (2000). Penetration of *Escherichia coli* O157:H7 into lettuce tissues as effected by inoculum size and temperature and the effect of chlorine treatment on cell viability. *Journal Food Protection*, 63, 434-440.

Tirpanalan, Ö., Zunabovic, M., Domig, K. J., Kneifel, W. (2011). Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances. *Formatex Editions*. Chapter Mini review: Antimicrobial strategies in the production of fresh-cut lettuce products, 176-188.

USDA Pesticide Data Program (2005). Lettuce Pesticide Residues. Disponível em: <http://www.whatsonmyfood.org/food.jsp?food=LT>. Acedido a: 16 Agosto 2012.

van Schothorst, M., Kleiss, T (1994). HACCP in the dairy industry. *Food Control*, 5, 162-166.

Vandekinderen, I., Camp, J. V., Devlieghere, F., Veramme, K., Denon, Q., Ragaert, P., Meulenaer, B. (2008). Effect of decontamination agents on the microbial population, sensorial quality, and nutrient content of grated carrots. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 5723-5731.

Vescovo, M., Torriani, S., Orsi, C., Macchiarola, F., Scolari, G. (1996). Application of antimicrobial producing lactic acid bacteria to control pathogens in ready to use vegetables. *Journal of Applied Bacteriology*, 113-119.

Vieiros, M. B., Proença, R. O. C., Santos, M. C. T., Kent-Smith, L., Rocha, A. (2009). Food safety practices in a Portuguese canteen. *Food Control*, 20, 936-941.

Virto, R., Mañas, P., Alvarez, I., Condon, S., Raso, J. (2005). Membrane damage and microbial inactivation by chlorine in the absence and presence of a chlorine-demanding substrate. *Applied and Environmental Microbiology*, 77, 5022-5028.

Yang, H., Swem, B. L., Li, Y. (2003). The effect of pH on inactivation of pathogenic bacteria on fresh-cut lettuce by dipping treatment with electrolyzed water. *Journal of Food and Science*, 68, 1013–1017.

Yuk, H. G., Yoo, M. Y., Yoon, J. W., Moon, K. D., Marschall, D. L., Oh, D. H. (2006) Effect of combined ozone and organic acid treatment for control of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* on lettuce. *Journal of Food Science*, 71, 83-87.

Watada, A. E., Qi, L. (1999). Quality control of minimally processed vegetables. *Symposium On Quality of Fresh and Fermented Vegetables*.

WHO (1998). Surface decontamination of fruit and vegetables eaten raw: a review. *World Health Organization*. Genebra.

WHO/ FAO (1998). Food quality and safety systems – *A training manual on food hygiene: the hazard analysis and critical control point (HACCP) system*. Disponível em: <http://www.fao.org/docrep/w8088e/w8088e00.HTM>. Acedido a: 5 Fevereiro, 2013.

WHO/ FAO (2001). Basic texts on food hygiene: hazard analysis and critical control point (HACCP) system and guidelines for its application. Segunda edição. Disponível em: <http://www.fao.org/docrep/005/Y1579E/y1579e03.htm..> Acedido a: 27 Fevereiro, 2013.

WHO (2004). Water treatment and pathogen control: process efficiency in achieving safe drinking water. *World Health Organization*. Genebra.

Wu, F. M., Doyle, M. P., Beuchat, L. R., Wells, J. G., Mintz, E. D., Swaminathan, B. (2000). Fate of *Shigella sonnei* on parsley and methods of disinfection. *Journal of Food Protection*, 63, 568-572.

Zhao, T., Clavero, M. R. S., Doyle, M. P., Beuchat, L. R. (1997). Health relevance of the presence of fecal coliforms in iced tea and in leaf tea. *Journal of Food Protection*, 60, 215-218.

Zhang, S., Farber, J. M. (1996). The effects of various disinfectants against *Listeria monocytogenes* on fresh-cut vegetables. *Food Microbiology*, 13, 311-321.

ANEXO I - Contagens de microrganismos aeróbios totais a 30°C (ufc/g).

Amostra 0					Amostra 1					Amostra 2				
AD	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	AD	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	AD	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷
	92	0	0	0		93	0	0	0		75	0	0	0
AD+CI	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵		AD+CI	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵		AD+CI	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	
	27	0	0			28	0	0			29	0	0	
AD+CI+V	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵		AD+CI+V	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵		AD+CI+V	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	
	22	0	0			0	0	0			0	0	0	

Amostra 3					Amostra 4					Amostra 5				
AD	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	AD	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	AD	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷
	Incontável	88	19	0		Incontável	63	0	0		Incontável	37	0	0
AD+CI	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵		AD+CI	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵		AD+CI	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	
	Incontável	Incontável	65			Incontável	Incontável	32			Incontável	Incontável	0	
AD+CI+V	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵		AD+CI+V	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵		AD+CI+V	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	
	Incontável	51	0			Incontável	115	0			44	0	0	

Amostra 6					Amostra 7					Amostra 8				
AD	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	AD	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	AD	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷
	Incontável	71	0	0		Incontável	0	0	0		93	0	0	0
AD+CI	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵		AD+CI	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵		AD+CI	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	
	Incontável	75	0			20	0	0			32	0	0	
AD+CI+V	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵		AD+CI+V	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵		AD+CI+V	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	
	82	0	0			0	0	0			0	0	0	

Amostra 9					Amostra 10					Amostra 11				
AD	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	AD	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	AD	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷
	Incontável	56	0	0		142	0	0	0		149	23	0	0
AD+CI	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵		AD+CI	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵		AD+CI	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	
	0	0	0			19	0	0			20	0	0	
AD+CI+V	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵		AD+CI+V	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵		AD+CI+V	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	
	0	0	0			0	0	0			72	0	0	

Amostra 12					Amostra 13					Amostra 14				
AD	10⁻⁴	10⁻⁵	10⁻⁶	10⁻⁷	AD	10⁻⁴	10⁻⁵	10⁻⁶	10⁻⁷	AD	10⁻⁴	10⁻⁵	10⁻⁶	10⁻⁷
	94	0	0	0		27	0	0	0		0	0	0	0
AD + Cl	10⁻³	10⁻⁴	10⁻⁵		AD + Cl	10⁻³	10⁻⁴	10⁻⁵		AD + Cl	10⁻³	10⁻⁴	10⁻⁵	
	0	0	0			0	0	0			20	0	0	
AD + Cl + V	10⁻³	10⁻⁴	10⁻⁵		AD + Cl + V	10⁻³	10⁻⁴	10⁻⁵		AD + Cl + V	10⁻³	10⁻⁴	10⁻⁵	
	0	0	0			0	0	0			0	0	0	

AD = Água destilada / AD + Cl = Água destilada e Cloro / AD + Cl + V = Água destilada, Cloro e Vinagre

ANEXO II - Contagens de *Escherichia coli* (ufc/g).

Amostra 0				Amostra 1				Amostra 2				Amostra 3			
AD	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	AD	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	AD	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	AD	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}
	0	0	0		0	0	0		0	0	0		0	0	0
AD + Cl	10^{-1}	10^{-2}		AD + Cl	10^{-1}	10^{-2}		AD + Cl	10^{-1}	10^{-2}		AD + Cl	10^{-1}	10^{-2}	
	0	0			0	0			0	0			0	0	
AD + Cl + V	10^{-1}	10^{-2}		AD + Cl + V	10^{-1}	10^{-2}		AD + Cl + V	10^{-1}	10^{-2}		AD + Cl + V	10^{-1}	10^{-2}	
	0	0			0	0			0	0			0	0	

Amostra 4				Amostra 5				Amostra 6				Amostra 7			
AD	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	AD	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	AD	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	AD	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}
	0	0	0		0	0	0		0	0	0		0	0	0
AD + Cl	10^{-1}	10^{-2}		AD + Cl	10^{-1}	10^{-2}		AD + Cl	10^{-1}	10^{-2}		AD + Cl	10^{-1}	10^{-2}	
	0	0			0	0			0	0			0	0	
AD + Cl + V	10^{-1}	10^{-2}		AD + Cl + V	10^{-1}	10^{-2}		AD + Cl + V	10^{-1}	10^{-2}		AD + Cl + V	10^{-1}	10^{-2}	
	0	0			0	0			0	0			0	0	

Amostra 8				Amostra 9				Amostra 10				Amostra 11			
AD	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	AD	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	AD	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	AD	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}
	0	0	0		0	0	0		0	0	0		42	0	0
AD + Cl	10^{-1}	10^{-2}		AD + Cl	10^{-1}	10^{-2}		AD + Cl	10^{-1}	10^{-2}		AD + Cl	10^{-1}	10^{-2}	
	0	0			0	0			23	0			0	0	
AD + Cl + V	10^{-1}	10^{-2}		AD + Cl + V	10^{-1}	10^{-2}		AD + Cl + V	10^{-1}	10^{-2}		AD + Cl + V	10^{-1}	10^{-2}	
	0	0			0	0			0	0			0	0	

Amostra 12				Amostra 13				Amostra 14			
AD	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	AD	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	AD	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}
	0	0	0		0	0	0		0	0	0
AD+Cl	10^{-1}	10^{-2}		AD+Cl	10^{-1}	10^{-2}		AD+Cl	10^{-1}	10^{-2}	
	0	0			0	0			0	0	
AD+Cl+V	10^{-1}	10^{-2}		AD+Cl+V	10^{-1}	10^{-2}		AD+Cl+V	10^{-1}	10^{-2}	
	0	0			0	0			0	0	

AD = Água destilada / AD + Cl = Água destilada e Cloro / AD + Cl + V = Água destilada, Cloro e Vinagre